

## ANTI-IL-6 RECEPTOR ANTIBODY

Technical Field

5           The present invention relates to pharmaceutical compositions comprising an anti-IL-6 receptor antibody as an active ingredient, methods for producing the compositions, and such.

Background Art

10           Antibodies are drawing attention as pharmaceuticals as they are highly stable in plasma (blood) and have few adverse effects. Of them, a number of IgG-type antibody pharmaceuticals are available on the market and many antibody pharmaceuticals are currently under development (Non-patent Documents 1 and 2).

15           IL-6 is a cytokine involved in various autoimmune diseases (Non-patent Document 3). It is thought that TOCILIZUMAB, a humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody, can be useful as a therapeutic agent for IL-6-associated diseases such as rheumatoid arthritis, since it specifically binds to the IL-6 receptor and thereby neutralizes its biological activity (Patent Documents 1 to 3 and Non-patent Document 4). In fact, TOCILIZUMAB has been approved as a therapeutic agent for Castleman's disease in Japan (Non-patent Document 5).

20           Various technologies applicable to second-generation antibody pharmaceuticals have been developed, including those that enhance effector function, antigen-binding activity, retention in plasma (blood), or stability, and those that reduce the risk of immunogenicity (antigenicity).

25           For methods of enhancing drug efficacy or reducing dosage, technologies that enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC) through amino acid substitution in the Fc domain of an IgG antibody have been reported (Non-patent Document 6). Furthermore, affinity maturation has been reported as a technology for enhancing antigen-binding activity or antigen-neutralizing activity (Non-patent Document 7). This technology enables enhancement of antigen-binding activity through introduction of amino acid mutations into the CDR region of a variable region or such. The enhancement of  
30           antigen-binding activity enables to improve *in vitro* biological activity or reduce dosage, and further to improve *in vivo* efficacy (Non-patent Document 8). Currently, clinical trials are being conducted to assess Motavizumab (produced by affinity maturation), which is expected to have a superior effect than Palivizumab (a first generation pharmaceutical of anti-RSV antibody) (Non-patent Document 9). Alternatively, a more superior effect can be produced by binding to  
35           a different epitope. For example, it has been reported that Oftamumab which recognizes an epitope different from that recognized by Rituximab (an anti-CD20 antibody) shows a more

superior effect *in vivo* than Rituximab. Currently, clinical trials are being conducted to assess Oftamumab (Non-patent Document 10). There is no previous report describing a human, humanized, or chimeric anti-IL-6 receptor antibody having an affinity greater than 1 nM.

5 A problem encountered with current antibody pharmaceuticals is high production cost associated with the administration of extremely large quantities of protein. For example, the dosage of TOCILIZUMAB, a humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody, has been estimated to be about 8 mg/kg/month by intravenous injection (Non-patent Document 4). Its preferred form of administration is thought to be subcutaneous formulation in chronic autoimmune diseases. In general, it is necessary that subcutaneous formulations are high concentration  
10 formulations. From the perspective of stability or such, the concentration limit for IgG-type antibody formulations is in general thought to be about 100 mg/ml (Non-patent Document 11). Low-cost, convenient second-generation antibody pharmaceuticals that can be administered subcutaneously in longer intervals can be provided by increasing the half-life of an antibody in the plasma to prolong its therapeutic effect and thereby reduce the amount of protein  
15 administered, and by conferring the antibody with high stability so that high concentration formulations can be prepared.

A possible method for improving antibody half-life in the plasma has been reported, and it artificially substitutes amino acids in the constant region (Non-patent Documents 12 and 13). However, introduction of non-natural sequences into the constant region is not preferred from  
20 the perspective of immunogenicity risk. Although it is preferable to introduce amino acid substitutions into the variable region rather than to the constant region from the perspective of immunogenicity, there is no report on improvement of antibody half-life in the plasma by substituting amino acids in the variable region, or improvement of the half-life of a human, humanized, or chimeric IL-6 receptor antibody in the plasma.

25 Methods for improving stability have been reported, and these include amino acid substitution or shuffling in the framework of the variable region to improve physicochemical stability (intermediate temperature of thermal denaturation) (Non-patent Documents 14 and 15). However, there is no previous report suggesting that such amino acid substitution improves the stability (suppresses the aggregation) in formulations that have a concentration higher than 100  
30 mg/ml. There is also no previous report on stable human or humanized IL-6 receptor antibody molecules in formulations of higher-than-100 mg/ml concentrations.

Another important problem encountered in developing biopharmaceuticals is immunogenicity. In general, the immunogenicity of mouse antibodies is reduced by antibody humanization. It is assumed that immunogenicity risk can be further reduced by using a  
35 germline framework sequence as a template in antibody humanization (Non-patent Document 16). However, even Adalimumab, a fully human anti-TNF antibody, showed high-frequency

(13% to 17%) immunogenicity, and the therapeutic effect was found to be reduced in patients who showed immunogenicity (Non-patent Documents 17 and 18). T-cell epitopes may be present even in the CDR regions of human antibodies, and these T-cell epitopes in CDR are a possible cause of immunogenicity. *In silico* and *in vivo* methods for predicting T-cell epitopes have been reported (Non-patent Documents 19 and 20). It is assumed that immunogenicity risk can be reduced by removing T-cell epitopes predicted using such methods (Non-patent Document 21). TOCILIZUMAB is a humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody obtained by humanizing a mouse PM-1 antibody. The antibody is yielded by CDR grafting using human NEW and REI framework sequences as template for H and L chains, respectively; however, a five-amino acid mouse sequence is retained in the antibody as framework and it is essential for retaining the antibody activity (Non-patent Document 22). There is no previous report on the substitution of a human sequence for the mouse sequence that remains in the framework of the humanized antibody TOCILIZUMAB, without loss of the activity. Furthermore, the CDR sequence of TOCILIZUMAB is a mouse sequence. Thus, there is a possibility that, like Adalimumab, TOCILIZUMAB contains T-cell epitopes in its CDR region, and may have a potential immunogenicity risk. Furthermore, TOCILIZUMAB belongs to the IgG1 subclass, and therefore can bind to Fc $\gamma$  receptor. Since Fc $\gamma$  receptor is expressed in antigen-presenting cells, molecules that bind to Fc $\gamma$  receptor tend to be presented as antigens. It has been reported that immunogenicity is and can be enhanced by linking a protein or peptide to the Fc domain of IgG1 (Non-patent Document 23 and Patent Document 4). In clinical trials of TOCILIZUMAB, antibodies against TOCILIZUMAB were not detected when TOCILIZUMAB was used at an effective dose (8 mg/kg). However, immunogenicity was observed at the doses of 2 and 4 mg/kg (Patent Document 5). This suggests that the immunogenicity of the humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB can be reduced. However, there has been no report on reducing the immunogenicity risk of TOCILIZUMAB (a humanized PM-1 antibody) by amino acid substitution.

In recent years, the safety of antibody pharmaceuticals has become of great importance. Interaction between the antibody Fc domain and Fc $\gamma$  receptor is assumed to be a cause of serious adverse effect encountered in phase-I clinical trials of TGN1412 (Non-patent Document 24). In antibody pharmaceuticals aimed at neutralizing the biological activity of an antigen, binding of the Fc domain to Fc $\gamma$  receptor, which is important for the effector function such as ADCC, is unnecessary. In addition, as described above, the binding to Fc $\gamma$  receptor may be unfavorable from the perspective of immunogenicity and adverse effects.

A method for impairing the binding to Fc $\gamma$  receptor is to alter the isotype of the IgG antibody from IgG1 to IgG2 or IgG4; however, this method cannot completely inhibit the binding (Non-patent Document 25). One of the methods reported for completely inhibiting the



binding to Fc $\gamma$  receptor is to artificially alter the Fc domain. For example, the effector functions of anti-CD3 antibodies and anti-CD4 antibodies cause adverse effects. Thus, amino acids that are not present in the wild type sequence were introduced into the Fc $\gamma$  receptor-binding domain of Fc (Non-patent Documents 26 and 27), and clinical trials are currently being conducted to assess anti-CD3 antibodies that do not bind to Fc $\gamma$  receptor and anti-CD4 antibodies that have a mutated Fc domain (Non-patent Documents 24 and 28). Alternatively, Fc $\gamma$  receptor-nonbinding antibodies can be prepared by altering the Fc $\gamma$ R-binding domain of IgG1 (at positions 233, 234, 235, 236, 327, 330, and 331 in the EU numbering system) to an IgG2 or IgG4 sequence (Non-patent Document 29 and Patent Document 6). However, these molecules contain novel non-natural peptide sequences of nine to twelve amino acids, which may constitute a T-cell epitope peptide and thus pose immunogenicity risk. There is no previous report on Fc $\gamma$  receptor-nonbinding antibodies that have overcome these problems.

Meanwhile, physicochemical properties of antibody proteins, in particular, homogeneity and stability, are very crucial in the development of antibody pharmaceuticals. For the IgG2 isotype, significant heterogeneity derived from disulfide bonds in the hinge region has been reported (Non-patent Document 30). It is not easy to manufacture them as a pharmaceutical in large-scale while maintaining the objective substances/related substances related heterogeneity derived from disulfide bonds between productions. Thus, single substances are desirable as much as possible for antibody molecules developed as pharmaceuticals.

IgG2 and IgG4 are unstable under acidic conditions. IgG type antibodies are in general exposed to acidic conditions in the purification process using Protein A and the virus inactivation process. Thus, there is a possibility that IgG2 and IgG4 undergo denaturation and aggregation during these processes. It is thus preferred that antibody molecules developed as pharmaceuticals are also stable under acidic conditions. Natural IgG2 and IgG4, and Fc $\gamma$  receptor-nonbinding antibodies derived from IgG2 or IgG4 (Non-patent Documents 25 and 26 and Patent Document 6) have such problems. It is desirable to solve these problems when developing antibodies into pharmaceuticals.

IgG1-type antibodies are relatively stable under acidic conditions, and the degree of heterogeneity originated from disulfide bonds in the hinge region is also lower in this type of antibodies. However, IgG1-type antibodies are reported to undergo non-enzymatic peptide bond cleavage in the hinge region in solutions when they are stored as formulations, and Fab fragments are generated as impurities as a result (Non-patent Document 31). It is desirable to overcome the generation of impurity when developing antibodies into pharmaceuticals.

Furthermore, for heterogeneity of the C-terminal sequences of an antibody, deletion of C-terminal amino acid lysine residue, and amidation of the C-terminal amino group due to deletion of both of the two C-terminal amino acids, glycine and lysine, have been reported



(Non-patent Document 32). It is preferable to eliminate such heterogeneity when developing antibodies into pharmaceuticals.

The constant region of an antibody pharmaceutical aimed for neutralizing an antigen preferably has a sequence that overcomes all the problems described above. However, a constant region that meets all the requirements has not been reported.

There is no previous report on the development of second-generation molecules that exhibit an improved antigen-neutralizing activity and produce a prolonged therapeutic effect even when the frequency of administration is reduced, and which have reduced immunogenicity and improved safety and physicochemical properties, as compared to first-generation molecules.

There is also no report on second-generation TOCILIZUMAB, which has more superiority in terms of the requirements described above by altering amino acid sequences of the variable and constant regions of the humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB.

Documents of related prior arts for the present invention are described below.

[Non-patent Document 1] Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnology* (2005) 23, 1073-1078

[Non-patent Document 2] Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005 Apr;59(3):389-96

[Non-patent Document 3] Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2006 Nov;2(11):619-26

[Non-patent Document 4] Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Broll J, Balint G, Emery P, Raemen F, Petersen J, Smolen J, Thomson D, Kishimoto T, CHARISMA Study Group. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, Tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):2817-29

[Non-patent Document 5] Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* 2005 Oct 15;106(8):2627-32

[Non-patent Document 6] Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol. Cells* 2005 Aug 31;20(1):17-29 Review

[Non-patent Document 7] Rothe A, Hosse RJ, Power BE. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2006 Feb;6(2):177-87

[Non-patent Document 8] Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R. A general method for greatly improving the affinity of

- antibodies by using combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005 Jun 14;102(24):8466-71. Epub. 2005 Jun 6
- [Non-patent Document 9] Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. *J. Mol. Biol.* (2007) 368, 652-665
- [Non-patent Document 10] Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Slootstra JW, Parren PW, Glennie MJ, van de Winkel JG. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):362-71
- [Non-patent Document 11] Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J. Pharm. Sci.* 2004 Jun;93(6):1390-402
- [Non-patent Document 12] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J. Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):346-56
- [Non-patent Document 13] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 1997 Jul;15(7):637-40
- [Non-patent Document 14] Ewert S, Honegger A, Pluckthun A. Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods*. 2004 Oct;34(2):184-99 Review
- [Non-patent Document 15] Damschroder MM, Widjaja L, Gill PS, Krasnoperov V, Jiang W, Dall'Acqua WF, Wu H. Framework shuffling of antibodies to reduce immunogenicity and manipulate functional and biophysical properties. *Mol. Immunol.* 2007 Apr;44(11):3049-60
- [Non-patent Document 16] Hwang WY, Almagro JC, Buss TN, Tan P, Foote J. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods*. 2005 May;36(1):35-42
- [Non-patent Document 17] Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak P, Wolbink GJ. Clinical response to adalimumab: The relationship with anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* Jul;66(7):921-6 Epub 2007 Feb 14
- [Non-patent Document 18] Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol. Int.* 2007 Jan;27(3):269-74
- [Non-patent Document 19] Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, Stas P, Lasters I. Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007

Mar;7(3):405-18

[Non-patent Document 20] Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP. Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 2005 May;3(5):991-1000

- 5 [Non-patent Document 21] Chirino AJ, Ary ML, Marshall SA. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* 2004 Jan 15;9(2):82-90

[Non-patent Document 22] Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 1993 Feb 15;53(4):851-6

- 10 [Non-patent Document 23] Guyre PM, Graziano RF, Goldstein J, Wallace PK, Morganelli PM, Wardwell K, Howell AL. Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* 1997 Nov-Dec;45(3-4):146-8

[Non-patent Document 24] Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007 Jan;6(1):75-92

- 15 [Non-patent Document 25] Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* 1998 Jun;76(6):231-48

[Non-patent Document 26] Cole MS, Anasetti C, Tso JY. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J. Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3613-21

- [Non-patent Document 27] Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, Dal Monte PR, Doyle ML, Brigham-Burke MR, Anderson D, Reff M, Newman R, Hanna N, Sweet RW, Truneh A. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J. Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1925-33
- 20

[Non-patent Document 28] Chau LA, Tso JY, Melrose J, Madrenas J. HuM291(Nuvion), a humanized Fc receptor-nonbinding antibody against CD3, anergizes peripheral blood T cells as partial agonist of the T cell receptor. *Transplantation* 2001 Apr 15;71(7):941-50

25

[Non-patent Document 29] Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J. Immunol.* 1999 Aug;29(8):2613-24

- [Non-patent Document 30] Chu GC, Chelius D, Xiao G, Khor HK, Coulibaly S, Bondarenko PV. Accumulation of Succinimide in a Recombinant Monoclonal Antibody in Mildly Acidic Buffers Under Elevated Temperatures. *Pharm. Res.* 2007 Mar 24;24(6):1145-56
- 30

[Non-patent Document 31] AJ Cordoba, BJ Shyong, D Breen, RJ Harris. Nonenzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* (2005) 818, 115-121

- 35 [Non-patent Document 32] Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy



chain. Anal. Biochem. 2007 Jan 1;360(1):75-83

[Patent Document 1] WO 92/19759

[Patent Document 2] WO 96/11020

[Patent Document 3] WO 96/12503

5 [Patent Document 4] US 20050261229A1

[Patent Document 5] WO 2004096273 (A1)

[Patent Document 6] WO 99/58572

### Disclosure of the Invention

#### 10 [Problems to be Solved by the Invention]

The present invention was achieved in view of the above circumstances. An objective of the present invention is to provide pharmaceutical compositions that comprise second-generation molecules, which are more superior than the humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB, and methods for producing such pharmaceutical compositions. 15 The second-generation molecules have been improved to exhibit enhanced antigen-neutralizing activity and pharmacokinetics (retention in plasma), and thus produce a prolonged therapeutic effect even when the frequency of administration is reduced; and they have also been improved to have reduced immunogenicity and improved safety and physicochemical properties, by altering amino acid sequences of the variable and constant regions of TOCILIZUMAB.

20

#### [Means for Solving the Problems]

The present inventors conducted dedicated studies to generate second-generation molecules that are more superior than the first-generation humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB, and have been improved to exhibit enhanced drug efficacy and 25 pharmacokinetics, and thus produce a prolonged therapeutic effect even when the frequency of administration is reduced. They have also been improved to have reduced immunogenicity and improved safety and physicochemical properties (stability and homogeneity), by altering amino acid sequences of the variable and constant regions of TOCILIZUMAB. As a result, the present inventors discovered multiple CDR mutations in the variable regions of TOCILIZUMAB 30 that enable to improve the antigen-binding activity (affinity). The present inventors thus successfully improved the affinity significantly using a combination of such mutations. The present inventors also successfully improved pharmacokinetics by altering the variable region sequence to lower the isoelectric point of an antibody. Furthermore, the present inventors successfully reduced immunogenicity risk by removing some of the *in silico*-predicted T-cell 35 epitope peptides in the variable regions and the mouse sequences that remain in the framework of TOCILIZUMAB. In addition, the present inventors successfully increased the stability at

higher concentrations. Furthermore, the present inventors also successfully discovered novel constant region sequences that do not bind to Fcγ receptor and that improve the stability under acidic conditions, heterogeneity originated from disulfide bonds in the hinge region, heterogeneity originated from the H-chain C terminus, and stability in high concentration formulations, while minimizing the generation of new T-cell epitope peptides in the constant region of TOCILIZUMAB. The present inventors successfully discovered second-generation molecules that are more superior to TOCILIZUMAB by combining amino acid sequence alterations in the CDR, variable, and constant regions.

The present invention relates to pharmaceutical compositions comprising a humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody that has been improved to exhibit more superior antigen (IL-6 receptor)-binding activity, more prolonged retention in plasma, more excellent safety and physicochemical properties (stability and homogeneity), and further reduced immunogenicity risk, by altering the amino acid sequences of variable and constant regions of the humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB; and methods for producing such pharmaceutical compositions. More specifically, the present invention provides:

[1] an anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

(a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino acid;

(b) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Trp at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino acid;

(c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Tyr at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;

(d) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;

(e) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;

(f) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;

(g) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Leu at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino

acid;

(h) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;

5 (i) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Ala at position 7 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;

(j) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino  
10 acid;

(k) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;

(l) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Leu at  
15 position 2, Ala at position 7, and Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;

(m) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

20 (n) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

(o) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino  
25 acid;

(p) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Asn at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

(q) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at  
30 position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid;

(r) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Gln at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;

35 (s) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino



acid;

(t) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid, and CDR3 in which Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has  
5 been substituted with another amino acid;

(u) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;

(v) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Gln at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 have been  
10 substituted with other amino acids;

(w) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid, and CDR3 in which Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of  
15 SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;

(x) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (k) and the light chain variable region of (v); and

(y) the antibody of (x) that further comprises the CDR2 of (e);

[2] an anti-IL-6 receptor antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2  
20 in which Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid;

[3] an anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

(a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 13 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another  
25 amino acid;

(b) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Gln at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid;

(c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Thr at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another  
30 amino acid;

(d) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid;

(e) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 13, Gln at position 16, Thr at position 23, and Thr at position 30 in the amino acid  
35

sequence of SEQ ID NO: 7 have been substituted with other amino acids;

(f) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR2 in which Arg at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 has been substituted with another amino acid;

5 (g) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Met at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid;

(h) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Leu at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino  
10 acid;

(i) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Arg at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid;

(j) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Val at  
15 position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid;

(k) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Met at position 4, Leu at position 5, Arg at position 16, and Val at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 have been substituted with other amino acids;

20 (l) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Gln at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 has been substituted with another amino acid;

(m) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 18 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 has been substituted with another  
25 amino acid;

(n) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR2 in which Lys at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 has been substituted with another amino acid;

(o) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Gln at  
30 position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with another amino acid;

(p) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Pro at position 24 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with another amino acid;

35 (q) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with another

amino acid;

(r) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Gln at position 23, Pro at position 24, and Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 have been substituted with other amino acids;

5 (s) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR4 in which Lys at position 10 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 has been substituted with another amino acid;

(t) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 has been substituted with another  
10 amino acid;

(u) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Gln at position 3 and Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 have been substituted with other amino acids;

(v) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 comprising the  
15 amino acid sequence of SEQ ID NO: 184;

(w) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the FR1 of (e), FR2 of (f), FR3 of (k), and FR4 of (l) or (u);

(x) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the FR1 of (m), FR2 of (n), FR3 of (r), and FR4 of (s); and

20 (y) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (w) and the light chain variable region of (x);

[4] an anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

(a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino  
25 acid;

(b) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;

(c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Ser at  
30 position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;

(d) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 and Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 have been substituted with other amino acids;

35 (e) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino



acid;

(f) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid;

5 (g) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid;

(h) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 2 and Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 have been  
10 substituted with other amino acids;

(i) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;

(j) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the CDR1 of (a), CDR2  
15 of (d), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3;

(k) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the CDR1 of (e), CDR2 of (h), and CDR3 of (i); and

(l) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (j) and the light chain variable region of (k);

20 [5] an anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

(a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 has been substituted with another amino acid, CDR2 in which Thr at position 9 and Ser at position 16 in the amino acid sequence of  
25 SEQ ID NO: 2 have been substituted with other amino acids, and CDR3 in which Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;

(b) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid, CDR2 in which Thr at position 2 and Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ  
30 ID NO:5 have been substituted with other amino acids, and CDR3 in which Gln at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 have been substituted with other amino acids;

(c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 22;

35 (d) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23;

(e) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (a) and the light chain variable region of (b); and

(f) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (c) and the light chain variable region of (d);

5 [6] a human antibody constant region of any one of:

(a) a human antibody constant region that comprises deletions of both Gly at position 329 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 330 (447 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19;

10 (b) a human antibody constant region that comprises deletions of both Gly at position 325 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (447 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20; and

(c) a human antibody constant region that comprises deletions of both Gly at position 326 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 327 (447 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;

15 [7] an IgG2 constant region in which the amino acids at positions 209 (330 in the EU numbering system), 210 (331 in the EU numbering system), and 218 (339 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

20 [8] an IgG2 constant region in which the amino acid at position 276 (397 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 has been substituted with another amino acid;

[9] an IgG2 constant region in which the amino acid at position 14 (131 in the EU numbering system), 102 (219 in the EU numbering system), and/or 16 (133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 has been substituted with another amino acid;

25 [10] the IgG2 constant region of [9], wherein the amino acids at positions 20 (137 in the EU numbering system) and 21 (138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

30 [11] an IgG2 constant region in which His at position 147 (268 in the EU numbering system), Arg at position 234 (355 in the EU numbering system), and/or Gln at position 298 (419 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 has been substituted with another amino acid;

[12] an IgG2 constant region in which the amino acids at positions 209 (330 in the EU numbering system), 210 (331 in the EU numbering system), 218 (339 in the EU numbering system), 276 (397 in the EU numbering system), 14 (131 in the EU numbering system), 16 (133 in the EU numbering system), 102 (219 in the EU numbering system), 20 (137 in the EU numbering system), and 21 (138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

35

[13] the IgG2 constant region of [12], which further comprises deletions of both Gly at position 325 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (447 in the EU numbering system);

5 [14] an IgG2 constant region in which the amino acids at positions 276 (397 in the EU numbering system), 14 (131 in the EU numbering system), 16 (133 in the EU numbering system), 102 (219 in the EU numbering system), 20 (137 in the EU numbering system), and 21 (138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

10 [15] the IgG2 constant region of [14], which further comprises deletions of both Gly at position 325 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (447 in the EU numbering system);

15 [16] an IgG2 constant region in which the Cys at position 14 (131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (137 in the EU numbering system), Ser at position 21 (138 in the EU numbering system), His at position 147 (268 in the EU numbering system), Arg at position 234 (355 in the EU numbering system), and Gln at position 298 (419 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

20 [17] the IgG2 constant region of [16], which further comprises deletions of both Gly at position 325 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (447 in the EU numbering system);

25 [18] an IgG2 constant region in which the Cys at position 14 (131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (137 in the EU numbering system), Ser at position 21 (138 in the EU numbering system), His at position 147 (268 in the EU numbering system), Arg at position 234 (355 in the EU numbering system), Gln at position 298 (419 in the EU numbering system), and Asn at position 313 (434 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

30 [19] the IgG2 constant region of [18], which further comprises deletions of both Gly at position 325 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (447 in the EU numbering system);

[20] an IgG4 constant region in which the amino acid at position 289 (409 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 has been substituted with another amino acid;

35 [21] an IgG4 constant region in which the amino acids at position 289 (409 in the EU numbering system), positions 14, 16, 20, 21, 97, 100, 102, 103, 104, and 105 (131, 133, 137, 138, 214, 217,



219, 220, 221, and 222 in the EU numbering system, respectively), and positions 113, 114, and 115 (233, 234, and 235 in the EU numbering system, respectively), have been substituted with other amino acids, and the amino acid at position 116 (236 in the EU numbering system) has been deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;

5 [22] the IgG4 constant region of [21], which further comprises deletions of both Gly at position 326 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 327 (447 in the EU numbering system);

[23] an IgG2 constant region in which Ala at position 209 (330 in the EU numbering system), Pro at position 210 (331 in the EU numbering system), Thr at position 218 (339 in the EU numbering system), Cys at position 14 (131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (137 in the EU numbering system), and Ser at position 21 (138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

15 [24] the IgG2 constant region of [23], which further comprises deletions of both Gly at position 325 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (447 in the EU numbering system);

[25] an IgG2 constant region in which Cys at position 14 (131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (137 in the EU numbering system), and Ser at position 21 (138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids;

25 [26] the IgG2 constant region of [25], which further comprises deletions of both Gly at position 325 (446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (447 in the EU numbering system);

[27] a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 24;

[28] a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 118;

[29] a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 25;

[30] a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 151;

30 [31] a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 152;

[32] a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 153;

[33] a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 164;

[34] a human antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 194 (M40ΔGK);

35 [35] a human antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 192 (M86ΔGK);

[36] an antibody comprising the constant region of any one of [6] to [32];  
 [37] the antibody of [36], which binds to an IL-6 receptor;  
 [38] an anti-IL-6 receptor antibody whose binding activity to an IL-6 receptor is 1 nM or less;  
 [39] an anti-IL-6 receptor antibody, wherein the measured isoelectric point of the full-length  
 5 antibody is 7.0 or lower or the theoretical isoelectric point of the variable region is 5.0 or lower;  
 [40] an anti-IL-6 receptor antibody, wherein the increase in the ratio of antibody aggregate after  
 one month at 25°C in a buffer containing 20 mM Histidine-HCl and 150 mM NaCl at pH 6.5 to  
 7.0 is 0.3% or less when the concentration of the antibody is 100 mg/ml; and  
 [41] a pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of [36] to [40].

10

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a graph showing the BaF/gp130-neutralizing activities of WT and RD\_6.

Fig. 2 is a graph showing a sensorgram for the interaction between rhIL-s6R (R&D systems) and WT.

15 Fig. 3 is a graph showing a sensorgram for the interaction between rhIL-s6R (R&D systems) and RD\_6.

Fig. 4-1 is a diagram showing a list of CDR mutations that improve the affinity or neutralizing activity in comparison with WT.

Fig. 4-2 is the continuation of Fig. 4-1.

20 Fig. 5 is a diagram showing a list of CDR mutations that in combination improve the affinity or neutralizing activity.

Fig. 6 is a graph showing the BaF/gp130-neutralizing activities of WT and RDC23.

Fig. 7 is a graph showing a sensorgram for the interaction between rhIL-s6R (R&D systems) and RDC23.

25 Fig. 8 is a graph showing a sensorgram for the interaction between rhsIL-6R and WT.

Fig. 9 is a graph showing a sensorgram for the interaction between rhsIL-6R and RDC23.

Fig. 10 is a graph showing a sensorgram for the interaction between SR344 and WT.

Fig. 11 is a graph showing a sensorgram for the interaction between SR344 and RDC23.

30 Fig. 12 is a graph showing the BaF/gp130-neutralizing activities of WT and H53L28.

Fig. 13 is a graph showing a sensorgram for the interaction between SR344 and H53/L28.

Fig. 14 is a graph showing transitions in the plasma concentrations of WT and H53/L28 after intravenous administration to mice.

35 Fig. 15 is a graph showing transitions in the plasma concentrations of WT and H53/L28 after subcutaneous administration to mice.

Fig. 16 is a graph showing the BaF/gp130-neutralizing activities of WT and PF1.

Fig. 17 is a graph showing a sensorgram for the interaction between SR344 and PF1.

Fig. 18 is a graph showing the result of testing the stability of WT and PF1 at high concentrations.

5 Fig. 19 is a graph showing transitions in the plasma concentrations of WT and PF1 after intravenous administration to human IL-6 receptor transgenic mice.

Fig. 20 is a graph showing transitions in the plasma concentrations of free human soluble IL-6 receptor after intravenous administration of WT or PF1 to human IL-6 receptor transgenic mice.

10 Fig. 21 is a graph showing the result of using gel filtration chromatography to analyze the content of aggregates in WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, IgG2-M397V, and IgG4-R409K purified by hydrochloric acid elution.

Fig. 22 is a diagram showing the result of cation exchange chromatography (IEC) analysis of WT-IgG1, WT-IgG2, and WT-IgG4.

15 Fig. 23 is a diagram showing predicted disulfide bonding in the hinge region of WT-IgG2.

Fig. 24 is a diagram showing predicted disulfide bonding in the hinge region of WT-IgG2-SKSC.

20 Fig. 25 is a diagram showing the result of cation exchange chromatography (IEC) analysis of WT-IgG2 and IgG2-SKSC.

Fig. 26 is a diagram showing the result of cation exchange chromatography (IEC) analysis of humanized PM-1 antibody, H chain C-terminal  $\Delta$ K antibody, and H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody.

25 Fig. 27 shows comparison of the amounts WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 $\Delta$ GK, WT-M17 $\Delta$ GK, and WT-M11 $\Delta$ GK bound to Fc $\gamma$ RI.

Fig. 28 is a graph showing comparison of the amounts WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 $\Delta$ GK, WT-M17 $\Delta$ GK, and WT-M11 $\Delta$ GK bound to Fc $\gamma$ RIIa.

Fig. 29 is a graph showing comparison of the amounts WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 $\Delta$ GK, WT-M17 $\Delta$ GK, and WT-M11 $\Delta$ GK bound to Fc $\gamma$ RIIb.

30 Fig. 30 is a graph showing comparison of the amounts WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 $\Delta$ GK, WT-M17 $\Delta$ GK, and WT-M11 $\Delta$ GK bound to Fc $\gamma$ RIIIa (Val).

Fig. 31 is a graph showing the increase of aggregation in a stability test for WT-IgG1, WT-M14 $\Delta$ GK, WT-M17 $\Delta$ GK, and WT-M11 $\Delta$ GK at high concentrations.

35 Fig. 32 is a graph showing the increase of Fab fragments in a stability test for WT-IgG1, WT-M14 $\Delta$ GK, WT-M17 $\Delta$ GK, and WT-M11 $\Delta$ GK at high concentrations.

Fig. 33 is a diagram showing the result of cation exchange chromatography (IEC)



analysis of WT-IgG2, WT-M14ΔGK, and WT-M31ΔGK.

Fig. 34 is a graph showing the BaF/gp130-neutralizing activities of WT and F2H/L39-IgG1.

Fig. 35 is a graph showing the plasma concentration time courses of antibodies after subcutaneous administration of WT, PF1, or F2H/L39-IgG1 at 1.0 mg/kg to cynomolgus monkeys.

Fig. 36 is a graph showing the time courses of CRP concentration in the groups of cynomolgus monkeys administered with WT or F2H/L39-IgG1.

Fig. 37 is a graph showing the time courses of free cynomolgus monkey IL-6 receptor concentration in the groups of cynomolgus monkeys administered with WT or F2H/L39-IgG1.

Fig. 38 is a graph showing the time courses of plasma concentrations of WT-IgG1 and WT-M14 after intravenous administration to human FcRn transgenic mice.

Fig. 39 is a graph showing the time courses of plasma concentrations of WT-IgG1, WT-M14, and WT-M58 after intravenous administration to human FcRn transgenic mice.

Fig. 40 is a graph showing the time courses of plasma concentrations of WT-IgG1, WT-M44, WT-M58, and WT-M73 after intravenous administration to human FcRn transgenic mice.

Fig. 41 is a diagram showing a cation exchange chromatography-based assessment of the effect on heterogeneity by the constant region of anti IL-6 receptor antibodies WT and F2H/L39, anti-IL-31 receptor antibody H0L0, and anti-RANKL antibody DNS.

Fig. 42 is a diagram showing a cation exchange chromatography-based assessment of the effect on heterogeneity by the CH1 domain cysteine of anti IL-6 receptor antibodies WT and F2H/L39.

Fig. 43 is a diagram showing a DSC-based assessment of the effect on denaturation peak by the CH1 domain cysteine of anti IL-6 receptor antibody WT.

Fig. 44 is a graph showing the activities of TOCILIZUMAB, the control, and Fv5-M83 to neutralize BaF/gp130.

Fig. 45 is a graph showing the activities of TOCILIZUMAB, Fv3-M73, and Fv4-M73 to neutralize BaF/gp130.

Fig. 46 is a graph showing the plasma concentration time courses of TOCILIZUMAB, the control, Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 in cynomolgus monkeys after intravenous administration.

Fig. 47 is a graph showing the time courses of CRP concentration in cynomolgus monkeys after intravenous administration of TOCILIZUMAB, the control, Fv3-M73, Fv4-M73, or Fv5-M83.

Fig. 48 is a graph showing the time courses of percentage of soluble IL-6 receptor

neutralization in cynomolgus monkeys after intravenous administration of TOCILIZUMAB, the control, Fv3-M73, Fv4-M73, or Fv5-M83.

### Mode for Carrying Out the Invention

5           The present invention provides pharmaceutical compositions comprising second-generation molecules that are more superior to the humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB, and have been improved to exhibit enhanced drug efficacy and pharmacokinetics, and thus produce a prolonged therapeutic effect even when the frequency of administration is reduced. They have also been improved to have reduced immunogenicity and  
10 improved safety and physicochemical properties, by altering amino acid sequences of the variable and constant regions of TOCILIZUMAB; and methods for producing such pharmaceutical compositions. The present invention also provides antibody constant regions that are suitable for pharmaceuticals.

          The present invention relates to anti-IL-6 receptor antibodies exhibiting superior  
15 antigen-binding activity, neutralizing activity, retention in plasma, stability, and/or homogeneity, and reduced immunogenicity risk.

          Preferably, the anti-IL-6 receptor antibody is a humanized PM-1 antibody (TOCILIZUMAB). More specifically, the present invention provides humanized PM-1 antibodies with enhanced antigen-binding activity, humanized PM-1 antibodies with enhanced  
20 neutralizing activity, humanized PM-1 antibodies showing improved pharmacokinetics, humanized PM-1 antibodies with reduced immunogenicity risk, humanized PM-1 antibodies with improved stability, and humanized PM-1 antibodies with improved homogeneity, all of which have been achieved through amino acid substitution.

          Humanized PM-1 antibodies bind to the human IL-6 receptor, and thus inhibit the  
25 binding between human IL-6 and the human IL-6 receptor. Herein, SEQ IDs in the Sequence Listing correspond to the amino acid sequences of humanized PM-1 antibodies shown below.

Heavy chain amino acid sequence: SEQ ID NO: 15

Light chain amino acid sequence: SEQ ID NO: 16

Heavy chain variable region amino acid sequence: SEQ ID NO: 17

30 Light chain variable region amino acid sequence: SEQ ID NO: 18

Heavy chain CDR1 (HCDR1) amino acid sequence: SEQ ID NO: 1

Heavy chain CDR2 (HCDR2) amino acid sequence: SEQ ID NO: 2

Heavy chain CDR3 (HCDR3) amino acid sequence: SEQ ID NO: 3

Heavy chain FR1 (HFR1) amino acid sequence: SEQ ID NO: 7

35 Heavy chain FR2 (HFR2) amino acid sequence: SEQ ID NO: 8

Heavy chain FR3 (HFR3) amino acid sequence: SEQ ID NO: 9

Heavy chain FR4 (HFR4) amino acid sequence: SEQ ID NO: 10

Light chain CDR1 (LCDR1) amino acid sequence: SEQ ID NO: 4

Light chain CDR2 (LCDR2) amino acid sequence: SEQ ID NO: 5

Light chain CDR3 (LCDR3) amino acid sequence: SEQ ID NO: 6

5 Light chain FR1 (LFR1) amino acid sequence: SEQ ID NO: 11

Light chain FR2 (LFR2) amino acid sequence: SEQ ID NO: 12

Light chain FR3 (LFR3) amino acid sequence: SEQ ID NO: 13

Light chain FR4 (LFR4) amino acid sequence: SEQ ID NO: 14

<Antibodies with enhanced affinity and neutralizing activity>

10 The present invention provides anti-human IL-6 receptor antibodies exhibiting strong human IL-6 receptor-binding and/or neutralizing activity. More specifically, the present invention provides the following antibodies of (a) to (y), and methods for producing the antibodies:

(a) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR1 in which Ser  
15 at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (HCDR1) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Trp (RD\_68), Thr (RD\_37), Asp (RD\_8), Asn (RD\_11), Arg (RD\_31), Val (RD\_32), Phe (RD\_33), Ala (RD\_34), Gln (RD\_35), Tyr (RD\_36), Leu (RD\_38), His (RD\_42),  
20 Glu (RD\_45), or Cys (RD\_46) is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Trp for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 26.

A sequence resulting from the substitution of Thr for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 27.

25 A sequence resulting from the substitution of Asp for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 28.

A sequence resulting from the substitution of Asn for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 29.

30 A sequence resulting from the substitution of Arg for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 30.

A sequence resulting from the substitution of Val for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 31.

A sequence resulting from the substitution of Phe for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 32.

35 A sequence resulting from the substitution of Ala for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 33.

A sequence resulting from the substitution of Gln for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 34.

A sequence resulting from the substitution of Tyr for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 35.

5 A sequence resulting from the substitution of Leu for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 36.

A sequence resulting from the substitution of His for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 37.

10 A sequence resulting from the substitution of Glu for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 38.

A sequence resulting from the substitution of Cys for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 39.

15 (b) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR1 in which Trp at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (HCDR1) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ile (RD\_9) or Val (RD\_30) is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Ile for Trp at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 40.

20 A sequence resulting from the substitution of Val for Trp at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 41.

(c) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR2 in which Tyr at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) has been substituted with another amino acid.

25 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Phe (RD\_82) is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Phe for Tyr at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 42.

30 (d) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR2 in which Thr at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Arg (RD\_79) is preferred.

35 A sequence resulting from the substitution of Arg for Thr at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 43.

(e) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR2 in which Thr



at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser (RD\_12) or Asn (RD\_61) is preferred.

5 A sequence resulting from the substitution of Ser for Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 44.

A sequence resulting from the substitution of Asn for Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 45.

10 (f) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR3 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ile (RD\_2), Val (RD\_4), Thr (RD\_80), or Leu (RD\_5) is preferred.

15 A sequence resulting from the substitution of Ile for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 46.

A sequence resulting from the substitution of Val for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 47.

A sequence resulting from the substitution of Thr for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 48.

20 A sequence resulting from the substitution of Leu for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 49.

(g) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR3 in which Leu at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) has been substituted with another amino acid.

25 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Thr (RD\_84) is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Thr for Leu at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 50.

30 (h) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala (RD\_3) or Ile (RD\_83) is preferred. In addition, the substitution of Ser (RDC\_14H) for Thr at position 5 is also preferred.

35 A sequence resulting from the substitution of Ala for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 51.

A sequence resulting from the substitution of Ile for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 52.

A sequence resulting from the substitution of Ser for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 53.

5 (i) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR3 in which Ala at position 7 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser (RD\_81) or Val (PF\_3H) is preferred.

10 A sequence resulting from the substitution of Ser for Ala at position 7 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 54.

A sequence resulting from the substitution of Val for Ala at position 7 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 55.

15 (j) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR3 in which Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Leu (PF\_4H) is preferred.

20 A sequence resulting from the substitution of Leu for Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 56.

(k) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR3 in which Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) have been substituted with other amino acids.

25 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Leu for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 (RD\_6) are preferred. Other preferred substitutions include: substitutions of Val for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 (RDC\_2H); substitutions of Ile for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 (RDC\_3H); substitutions of Thr for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 (RDC\_4H); substitutions of Val for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 (RDC\_5H); substitutions of  
30 Ile for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 (RDC\_6H); substitutions of Thr for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 (RDC\_7H); and substitutions of Leu for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 (RDC\_8H).

A sequence resulting from the substitutions of Leu for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 57.

35 A sequence resulting from the substitutions of Val for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 58.

A sequence resulting from the substitutions of Ile for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 59.

A sequence resulting from the substitutions of Thr for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 60.

5 A sequence resulting from the substitutions of Val for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 61.

A sequence resulting from the substitutions of Ile for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 62.

10 A sequence resulting from the substitutions of Thr for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 63.

A sequence resulting from the substitutions of Leu for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 64.

15 (l) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR3 in which Leu at position 2, Ala at position 7, and Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Thr for Leu at position 2, Val for Ala at position 7, and Leu for Met at position 8 (RD\_78) are preferred.

20 A sequence resulting from the substitutions of Thr for Leu at position 2, Val for Ala at position 7, and Leu for Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 is shown in SEQ ID NO: 65.

(m) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) has been substituted with another amino acid.

25 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Phe (RD\_18) is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Phe for Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 is shown in SEQ ID NO: 66.

30 (n) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR1 in which Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Arg (RD\_26) or Thr (RD\_20) is preferred.

35 A sequence resulting from the substitution of Arg for Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 is shown in SEQ ID NO: 67.

A sequence resulting from the substitution of Thr for Gln at position 4 in the amino acid

sequence of SEQ ID NO: 4 is shown in SEQ ID NO: 68.

(o) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR1 in which Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) has been substituted with another amino acid.

5           The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Phe (RD\_73) is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Phe for Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 is shown in SEQ ID NO: 69.

10           (p) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR1 in which Asn at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser (RD\_27) is preferred.

15           A sequence resulting from the substitution of Ser for Asn at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 is shown in SEQ ID NO: 70.

(q) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR2 in which Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2) has been substituted with another amino acid.

20           The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Gly is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Gly for Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 is shown in SEQ ID NO: 71.

25           (r) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR3 in which Gln at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however substitution to Gly (RD\_28), Asn (RD\_29), or Ser (RDC\_15L) is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Gly for Gln at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 72.

30           A sequence resulting from the substitution of Asn for Gln at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 73.

A sequence resulting from the substitution of Ser for Gln at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 74.

35           (s) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR3 in which Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid.



The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Ser for Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 75.

5 (t) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR1 in which Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) has been substituted with another amino acid, and a light chain CDR3 in which Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) has been substituted with another amino acid.

10 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) is preferably substituted with Phe, while Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) is preferably substituted with Ser (RD\_72).

15 (u) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Arg (RD\_23) or Ser is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Arg for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 76.

20 A sequence resulting from the substitution of Ser for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 77.

(v) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a light chain CDR3 in which Gln at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) have been substituted with other amino acids.

25 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Gly for Gln at position 1 and Ser for Thr at position 5 (RD\_22) are preferred. Other preferred substitutions include substitutions of Gly for Gln at position 1 and Arg for Thr at position 5 (RDC\_11L).

30 A sequence resulting from the substitutions of Gly for Gln at position 1 and Ser for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 78.

A sequence resulting from the substitutions of Gly for Gln at position 1 and Arg for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 79.

35 (w) An anti-human IL-6 receptor antibody comprising a heavy chain CDR2 in which Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) has been substituted with another amino acid, and a heavy chain CDR3 in which Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) have been substituted with other amino

acids.

Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) is preferably replaced with Asn. Furthermore, preferred combinations of amino acids for substitutions of Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3)

5 include: Leu and Ala (RDC\_27H); Val and Ala (RDC\_28H); Ile and Ala (RDC\_30H); Thr and Ala (RDC\_4H); Val and Ile (RDC\_29H); Ile and Ile (RDC\_32H); Thr and Ile (RDC\_7H); and Leu and Ile (RDC\_8H).

(x) An antibody that comprises a variable region comprising the heavy chain CDR3 of (k) and a variable region comprising the light chain CDR3 of (v).

10 (y) The antibody of (x), which further comprises the heavy chain CDR2 of (e).

The present invention provides antibodies comprising at least the amino acid substitution of any one of (a) to (y) described above and methods for producing the antibodies. Thus, the antibodies of the present invention can also comprise other amino acid substitutions in addition to the amino acid substitution of any one of (a) to (y) described above. Furthermore, 15 the antibodies of the present invention also include antibodies comprising a combination of any amino acid substitutions of (a) to (y) described above. The amino acid substitutions of (a) to (y) described above include substitutions of the CDR amino acid sequences described above to other amino acids. Amino acid substitutions other than those of (a) to (y) described above include, for example, amino acid sequence substitutions, deletions, additions, and/or insertions in 20 other CDR regions. Such substitutions also include amino acid sequence substitutions, deletions, additions, and/or insertions in the FR regions. Such substitutions further include substitutions, deletions, additions, and/or insertions in the constant regions.

Furthermore, the antibodies of the present invention also include antibodies in which a high affinity CDR discovered in the present invention is grafted into any framework other than a 25 humanized PM-1 antibody. The antibodies of the present invention also include antibodies in which the loss of affinity as a result of grafting a high affinity CDR discovered in the present invention into any framework other than a humanized PM-1 antibody has been compensated by mutations introduced into the framework region to restore the original affinity (see, for example, Curr. Opin. Biotechnol. 1994 Aug;5(4):428-33), and antibodies in which the loss has been 30 compensated by mutations introduced into the CDR region to restore the original affinity (see, for example, US 2006/0122377).

In the present invention, the amino acid substitution of any one of (a) to (y) described above is preferably introduced into a humanized PM-1 antibody. Humanized PM-1 antibodies introduced with the amino acid substitution of any one of (a) to (y) described above have strong 35 IL-6 receptor-neutralizing activity. Humanized PM-1 antibodies introduced with the amino acid substitution of any one of (a) to (y) described above are effective as therapeutic agents for

IL-6-associated inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

Antibodies comprising the amino acid substitution of any one of (a) to (y) described above can also be referred to as, for example, (1) or (2) described below. An example of antibody comprising the substitution of (a) is described here; other antibodies comprising the substitution of any one of (b) to (y) can also be referred to in the same way.

(1) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 comprising an amino acid sequence in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino acid

(2) An antibody that comprises an H chain comprising CDR1 comprising an amino acid sequence in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino acid

<Antibodies with enhanced binding activity>

The present invention further provides anti-IL-6 receptor antibodies with strong IL-6 receptor-binding activity. Herein, “anti-IL-6 receptor antibodies with strong IL-6 receptor-binding activity” typically refers to antibodies whose affinity is measured to be 1 nM or less at 37°C under physiological conditions, preferably 0.1 nM or less, and more preferably 0.04 nM or less. Such anti-IL-6 receptor antibodies with strong IL-6 receptor binding activity are assumed to have an enhanced activity of neutralizing the biological activity of the antigen.

There is no limitation on the type of amino acid substitutions introduced to the present invention’s anti-IL-6 receptor antibodies with strong IL-6 receptor binding activity. Such amino acid substitutions include, for example, the above-described amino acid substitutions.

The type of IL-6 receptor is not particularly limited; however, human IL-6 receptor is preferred.

The binding activity can be determined by methods known to those skilled in the art, for example, using Biacore (BIACORE) or such, based on surface plasmon resonance (SPR).

<Antibodies having a CDR sequence with reduced immunogenicity risk>

The present invention also provides anti-IL-6 receptor antibodies with reduced immunogenicity, in particular, humanized PM-1 antibodies. The immunogenicity is assumed to be enhanced when the sequence of an antibody contains a T-cell epitope that binds to HLA.

Thus, the immunogenicity risk for an antibody can be reduced by removing the T-cell epitope from the antibody sequence through sequence substitution.

The present invention provides light chain variable regions of humanized anti-human IL-6 receptor antibodies with reduced immunogenicity, in particular, those of humanized PM-1 antibodies, from which T-cell epitopes have been removed through substituting other amino acids in the antibody amino acid sequences, in particular, CDR sequences. The present invention also provides antibodies comprising such light chain variable regions.

More specifically, the present invention provides light chain CDR2 in which Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2) has been substituted with another amino acid. The present invention also provides light chain variable regions comprising such light chain CDR2. The present invention also provides anti-IL-6 receptor antibodies comprising such light chain variable region. The amino acid sequence after substitution is not particularly limited; however, substitution to Gly is preferred. A sequence comprising the substitution of Gly for Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 is shown in SEQ ID NO: 71. The amino acid substitution is preferably introduced into a light chain variable region of a humanized PM-1 antibody.

<FR and CDR of H53/L28>

The present invention also provides anti-human IL-6 receptor antibodies with improved pharmacokinetic, increased stability, and/or reduced immunogenicity. The half-lives of IgGs sharing the same Fc domain in plasma have been found to be correlated to isoelectric points with a high correlation coefficient. Then, the present inventors tried altering the isoelectric points of the variable regions of two antibodies against different antigens, and successfully controlled their half-lives in plasma without altering their Fc domains irrespective of the antigen type. The rate of non-specific antibody uptake by endothelial cells is assumed to depend on the physicochemical Coulomb interaction between IgG and negatively charged cell surface. Lowering the isoelectric point of IgG impairs the Coulomb interaction, which reduces the non-specific uptake by endothelial cells, and as a result, the metabolism in endothelial cells is reduced. This can improve pharmacokinetics.

Specifically, the present invention provides anti-human IL-6 receptor antibodies with reduced isoelectric point and improved pharmacokinetics, by substituting amino acids in the amino acid sequence of an anti-IL-6 receptor antibody, in particular, a humanized PM-1 antibody. Specifically, the humanized PM-1 antibody is altered to reduce its isoelectric point by substituting other amino acids at H13 (amino acid at position 13 in SEQ ID NO: 7), H16 (amino acid at position 16 in SEQ ID NO: 7), H43 (amino acid at position 8 in SEQ ID NO: 8), H81 (amino acid at position 16 in SEQ ID NO: 9), H105 (amino acid at position 3 in SEQ ID NO: 10), L18 (amino acid at position 18 in SEQ ID NO: 11), L45 (amino acid at position 11 in SEQ ID NO: 12), L79 (amino acid at position 23 in SEQ ID NO: 13), L107 (amino acid at position 10 in SEQ ID NO: 14), H31 (amino acid at position 1 in SEQ ID NO: 1), L24 (amino acid at position 1 in SEQ ID NO: 4), and/or L53 (amino acid at position 4 in SEQ ID NO: 5), where positions are numbered according to Kabat's numbering system (Kabat EA *et al.*, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH). These substitutions can lower the isoelectric point of a humanized PM-1 antibody without affecting its binding activity and stability. Some amino acid residues originated from the mouse sequence remain unsubstituted in the humanized PM-1



antibody to maintain its binding activity even after humanization of the mouse sequence. More specifically, amino acids at H27 (amino acid at position 27 in SEQ ID NO: 7), H28 (amino acid at position 28 in SEQ ID NO: 7), H29 (amino acid at position 29 in SEQ ID NO: 7), H30 (amino acid at position 30 in SEQ ID NO: 7), and H71 in the humanized PM-1 antibody (positions are numbered according to Kabat's numbering system described above) are of the mouse sequence. HFR1 can be converted into a human sequence by substituting H13, H16, H23, and H30, which enables to produce an antibody whose immunogenicity risk is lower than that of the humanized PM-1 antibody. Furthermore, since the humanized PM-1 antibody is an antibody humanized by CDR grafting, its stability may be further improved. Antibodies can be stabilized, for example, by substituting hydrophilic amino acids for amino acid residues exposed on the surface of the antibody variable region. Alternatively, antibodies can also be stabilized by altering the CDR sequence to a consensus sequence. The humanized PM-1 antibody can be stabilized by a substitution of Ile for Met at H69 (amino acid position 4 in SEQ ID NO: 9) (stabilization of the hydrophobic core), Ser for Leu at H70 (amino acid at position 5 in SEQ ID NO: 9) (conversion of the surface-exposed residue to a hydrophilic residue), Asn for Thr at H58 (amino acid at position 9 in SEQ ID NO: 2) (alternation of the heavy chain CDR2 to a consensus sequence), Gly for Ser at H65 (amino acid at position 16 in SEQ ID NO: 2) (substitution of Gly in the  $\beta$  turn region and alternation of the heavy chain CDR2 to a consensus sequence), or Ser for Thr at L93 (amino acid at position 5 in SEQ ID NO: 6) (conversion of the surface-exposed residue to a hydrophilic residue) (positions are numbered according to Kabat's numbering system described above). Alternatively, *in silico*-predicted T-cell epitopes can be removed by substituting Gly for Thr at L51 at position 2 in LCDR2 (SEQ ID NO: 5) described above, and this can reduce the immunogenicity risk without affecting the binding activity and stability. Anti-IL-6 receptor antibodies with improved stability and antibody pharmacokinetics, as well as reduced immunogenicity can be obtained by using these amino acid substitutions in combination.

Such antibodies include, for example, the antibodies of (1) to (37) below.

(1) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 13 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Lys is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Lys for Arg at position 13 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 is shown in SEQ ID NO: 80.

(2) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Gln at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution of Glu is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Glu for Gln at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 is shown in SEQ ID NO: 81.

- 5 (3) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Thr at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred.

- 10 A sequence resulting from the substitution of Ala for Thr at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 is shown in SEQ ID NO: 82.

(4) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid.

- 15 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Ser for Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 is shown in SEQ ID NO: 83.

- 20 (5) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 13, Gln at position 16, Thr at position 23, and Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Lys for Arg at position 13, Glu for Gln at position 16, Ala for Thr at position 23, and Ser for Thr at position 30 are preferred.

- 25 A sequence resulting from the substitutions of Lys for Arg at position 13, Glu for Gln at position 16, Ala for Thr at position 23, and Ser for Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 is shown in SEQ ID NO: 84.

- 30 (6) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR2 in which Arg at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Glu for Arg at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 is shown in SEQ ID NO: 85.

- 35 (7) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Met at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another

amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ile is preferred.

5 A sequence resulting from the substitution of Ile for Met at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 is shown in SEQ ID NO: 86.

(8) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Leu at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid.

10 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Ser for Leu at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 is shown in SEQ ID NO: 87.

15 (9) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Arg at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Lys is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Lys for Arg at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 is shown in SEQ ID NO: 88.

20 (10) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Val at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred.

25 A sequence resulting from the substitution of Ala for Val at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 is shown in SEQ ID NO: 89.

(11) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Met at position 4, Leu at position 5, Arg at position 16, and Val at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 (HFR3) have been substituted with other amino acids.

30 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ile for Met at position 4, Ser for Leu at position 5, Lys for Arg at position 16, and Ala for Val at position 27 are preferred.

35 A sequence resulting from the substitutions of Ile for Met at position 4, Ser for Leu at position 5, Lys for Arg at position 16, and Ala for Val at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 is shown in SEQ ID NO: 90.

(12) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which

Gln at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (HFR4) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred.

5 A sequence resulting from the substitution of Glu for Gln at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 is shown in SEQ ID NO: 91.

(13) An antibody that comprises a light chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 18 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 (LFR1) has been substituted with another amino acid.

10 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Ser for Arg at position 18 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 is shown in SEQ ID NO: 92.

(14) An antibody that comprises a light chain variable region comprising FR2 in which  
15 Lys at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 (LFR2) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred.

20 A sequence resulting from the substitution of Glu for Lys at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 is shown in SEQ ID NO: 93.

(15) An antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Gln at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with another amino acid.

25 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Glu for Gln at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 is shown in SEQ ID NO: 94.

(16) An antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Pro at position 24 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with  
30 another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Ala for Pro at position 24 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 is shown in SEQ ID NO: 95.

35 (17) An antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with



another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred.

5 A sequence resulting from the substitution of Ala for Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 is shown in SEQ ID NO: 96.

(18) An antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Gln at position 23, Pro at position 24, and Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 (LFR3) have been substituted with other amino acids.

10 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Glu for Gln at position 23, Ala for Pro at position 24, and Ala for Ile at position 27 are preferred.

A sequence resulting from the substitutions of Glu for Gln at position 23, Ala for Pro at position 24, and Ala for Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 is shown in SEQ ID NO: 97.

15 (19) An antibody that comprises a light chain variable region comprising FR4 in which Lys at position 10 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 (LFR4) has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred.

20 A sequence resulting from the substitution of Glu for Lys at position 10 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 is shown in SEQ ID NO: 98.

(20) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (HFR4) has been substituted with another amino acid.

25 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Thr is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Thr for Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 is shown in SEQ ID NO: 132.

30 (21) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Gln at position 3 and Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (HFR4) have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Glu for Gln at position 3 and Thr for Ser at position 5 are preferred.

35 A sequence resulting from the substitutions of Glu for Gln at position 3 and Thr for Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 is shown in SEQ ID NO: 133.

(22) An antibody that comprises a heavy chain variable region of a humanized PM-1

antibody comprising the amino acid substitutions of (5), (6), (11), and (21).

(23) An antibody that comprises a light chain variable region of a humanized PM-1 antibody comprising the amino acid substitutions of (13), (14), (18), and (19).

5 (24) An antibody that comprises the heavy chain variable region of (22) and the light chain variable region of (23).

(25) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (HCDR1) has been substituted with another amino acid.

10 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution of Asp is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Asp for Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 is shown in SEQ ID NO: 28.

15 (26) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution of Gly is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Gly for Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 99.

20 (27) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 and Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Asn for Thr at position 9 and Gly for Ser at position 16 are preferred.

25 A sequence resulting from the substitutions of Asn for Thr at position 9 and Gly for Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 100.

(28) An antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) has been substituted with another amino acid.

30 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution of Gln is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Gln for Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 is shown in SEQ ID NO: 101.

35 (29) An antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Glu for Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 is shown in SEQ ID NO: 102.

5 (30) An antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 2 and Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2) have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Gly for Thr at position 2 and Glu for Arg at position 4 are preferred.

10 A sequence resulting from the substitutions of Gly for Thr at position 2 and Glu for Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 is shown in SEQ ID NO: 103.

(31) An antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) has been substituted with another amino acid.

15 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ser is preferred.

A sequence resulting from the substitution of Ser for Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 is shown in SEQ ID NO: 77.

20 (32) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid substitutions of (25) and (27).

(33) An antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid substitutions of (28), (30), and (31).

(34) An antibody that comprises the heavy chain variable region of (32) and the light chain variable region of (33).

25 (35) An antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 104 (VH of H53/L28).

(36) An antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 105 (VL of H53/L28).

30 (37) An antibody that comprises the heavy chain variable region of (35) and the light chain variable region of (36).

Any amino acid substitutions of (1) to (37) described above are preferably introduced into a humanized PM-1 antibody. The present invention provides antibodies comprising at least the amino acid substitution of any one of (1) to (37) described above and methods for producing those antibodies. Thus, the antibodies of the present invention also include  
35 antibodies comprising other amino acid substitutions in addition to the amino acid substitution of any one of (1) to (37) described above. The antibodies of the present invention also include

antibodies comprising combinations of multiple amino acid substitutions of (1) to (37) described above. The amino acid substitutions of (1) to (37) described above include, for example, substitutions in the amino acid sequences of FR and CDR described above. Amino acid substitutions other than those of (1) to (37) described above include other substitutions, deletions, additions, and/or insertions in FR and CDR sequences than those described above. The amino acid substitutions also include substitutions, deletions, additions, and/or insertions in the amino acid sequences of constant regions.

Furthermore, in addition to those described above, amino acid alternations that result in a lower isoelectric point without loss of the activity of anti-IL-6 receptor antibody, include, for example, substitutions of Lys at position 15 and/or Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 with other amino acids. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Gln for Lys at position 15 and Asp for Ser at position 16 are preferred. A sequence comprising the substitutions of Gln for Lys at position 15 and Asp for Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 121. Alternatively, such amino acid substitutions may also be introduced into the amino acid sequence of SEQ ID NO: 100. A sequence comprising the substitutions of Gln for Lys at position 15 and Asp for Gly at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 100 is shown in SEQ ID NO: 122. Thus, the present invention provides antibodies that comprise a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Lys at position 15 and/or Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or 100 have been substituted with other amino acids.

Other alterations that result in a lower isoelectric point include substitution of Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred. An amino acid sequence comprising the substitution of Glu for Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 is shown in SEQ ID NO: 123. Alternatively, this amino acid substitution may also be introduced into the amino acid sequence of SEQ ID NO: 101. An amino acid sequence comprising the substitution of Glu for Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 101 is shown in SEQ ID NO: 124. Thus, the present invention provides antibodies that comprise a light chain variable region comprising CDR1 in which Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 or 101 has been substituted with another amino acid.

Other alterations that result in a lower isoelectric point include substitution of His at position 6 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 with another amino acid. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Glu is preferred. An amino acid sequence comprising the substitution of Glu for His at position 6 in the amino



acid sequence of SEQ ID NO: 5 is shown in SEQ ID NO: 125. Alternatively, this amino acid substitution may also be introduced into the amino acid sequence of SEQ ID NO: 103. An amino acid sequence comprising the substitution of Glu for His at position 6 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 103 is shown in SEQ ID NO: 126. Thus, the present invention  
5 provides antibodies that comprise a light chain variable region comprising CDR2 in which His at position 6 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 or 103 has been substituted with another amino acid.

Furthermore, alternations that result in reduced immunogenicity risk include substitution of Val for Ala at position 27 (H89 in Kabat's numbering system) in the amino acid  
10 sequence of heavy chain FR3 of SEQ ID NO: 90. An amino acid sequence comprising the substitution of Val for Ala at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 90 is shown in SEQ ID NO: 127. Thus, the present invention provides antibodies that comprise a heavy chain variable region comprising FR3 in which Val has been substituted for Ala at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 90.

The only mouse sequence that remains in the amino acid sequences of heavy chain FR3 of SEQ ID NO: 9 and 90 is Arg at position 6 (H71 in Kabat's numbering system). Anti-human IL-6 receptor antibodies having a framework consisting entirely of human sequences can be produced by using as a FR3 sequence, the human sequence of human VH1 subclass (SEQ ID NO: 128) or human VH3 subclass (SEQ ID NO: 129) where Arg is conserved at H71. Thus,  
15 the present invention provides antibodies that comprise a heavy chain variable region comprising the FR3 of SEQ ID NO: 128 or 129.

Furthermore, alternations that improve stability include substitution of Ile for Ser at position 5 (H107 in Kabat's numbering system) in the amino acid sequence of heavy chain FR4 of SEQ ID NO: 10. An amino acid sequence comprising the substitution of Ile for Ser at  
25 position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 is shown in SEQ ID NO: 130. Alternatively, this amino acid sequence may also be introduced into the amino acid sequence of SEQ ID NO: 91. An amino acid sequence comprising the substitution of Ile for Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 91 is shown in SEQ ID NO: 131. Thus, the present invention provides antibodies that comprise a heavy chain variable region comprising  
30 FR4 in which Ile has been substituted for Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 or 91.

Such amino acid substitutions are preferably introduced into the humanized PM-1 antibody, H53/L28 (an antibody comprising the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 104 and the light chain variable region of SEQ ID NO: 105), or PF1 antibody (an antibody  
35 comprising the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 22 and the light chain variable region of SEQ ID NO: 23). The present invention provides antibodies comprising at least such

amino acid substitutions and methods for producing the antibodies. Thus, the antibodies of the present invention include antibodies comprising, in addition to such amino acid substitutions, the amino acid substitution of any one of (1) to (37) described above and/or other amino acid substitutions than those of (1) to (37) described above. Amino acid substitutions other than those of (1) to (37) described above include other substitutions, deletions, additions, and/or insertions in FR and CDR sequences than those described above. The amino acid substitutions also include substitutions, deletions, additions, and/or insertions in the amino acid sequences of constant regions.

<Anti-human IL-6 receptor antibodies with low isoelectric point>

The present invention also provides anti-IL-6 receptor antibodies with a low isoelectric point. The antibodies of the present invention with low isoelectric point include antibodies in which the measured isoelectric point of the whole antibody is low and antibodies in which the theoretical isoelectric point of the variable region (VH/VL) is low.

Herein, “anti-IL-6 receptor antibodies in which the measured isoelectric point of the whole antibody is low” typically refers to antibodies in which the measured isoelectric point is 7.5 or less, preferably 7.0 or less, and more preferably 6.0 or less. The measured isoelectric point can be determined by methods known to those skilled in the art, for example, non-denaturation gel isoelectric focusing or capillary isoelectric focusing.

Herein, “anti-IL-6 receptor antibodies in which the theoretical isoelectric point of the variable region is low” typically refers to antibodies in which the theoretical isoelectric point is 5.5 or less, preferably 5.0 or less, and more preferably 4.0 or less. The theoretical isoelectric point can be determined by methods known to those skilled in the art. For example, the theoretical isoelectric points of VH and VL of a variable region can be computed by using software such as GENETYX (GENETYX CORPORATION).

There is no limitation on the type of amino acid substitution to be introduced to obtain anti-IL-6 receptor antibodies of the present invention with low isoelectric point. Such amino acid substitutions include, for example, the amino acid substitutions described above. Such anti-IL-6 receptor antibodies with low isoelectric point are assumed to show enhanced pharmacokinetics.

The type of IL-6 receptor is not particularly limited; however, human IL-6 receptor is preferred.

<Anti-human IL-6 receptor antibodies that are stable at high concentrations>

Furthermore, the present invention provides anti-IL-6 receptor antibodies that are stable at high concentrations.

Herein, “stable at high concentrations” means that the increase in the proportion of aggregates of anti-IL-6 receptor antibody ([peak area for aggregate in gel filtration

chromatogram]/[total peak area in gel filtration chromatogram] x 100) generated in a high-concentration antibody solution (100 mg/ml) at 25°C in one month is 0.3% or less, preferably 0.2% or less, and more preferably 0.1% or less when the antibody is in a buffer of pH 6.5 to 7.0 properly selected for subcutaneous administration, for example, 20 mM histidine-HCl, 150 mM NaCl. The concentration of anti-IL-6 receptor antibody may be 100 mg/ml or higher, for example, 200 or 300 mg/ml.

There is no limitation on the anti-IL-6 receptor antibodies of the present invention that are stable at high concentrations. The antibodies can be prepared, for example, with the above-described amino acid substitutions or such.

The type of IL-6 receptor is not particularly limited; however, human IL-6 receptor is preferred.

The present invention also provides humanized PM-1 antibodies comprising any one of the amino acid substitutions of (1) to (37) described above and further comprising any of the amino acid substitutions of (a) to (y) described above to improve their binding activity and/or neutralizing activity. In an embodiment, such antibodies include those comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 22 (PF1\_H) and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23 (PF1\_L) (PF1), but are not limited thereto.

Furthermore, the present invention provides anti-IL-6 receptor antibodies of any of the following:

(A) a heavy chain variable region that comprises CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 165 (CDR1 of VH5-M83), CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 166 (CDR2 of VH5-M83), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 167 (CDR3 of VH5-M83);

(B) a light chain variable region that comprises CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 101 (CDR1 of VL5), CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 168 (CDR2 of VL5), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 79 (CDR3 of VL5);

(C) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (A) and the light chain variable region of (B);

(D) a heavy chain variable region that comprises CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 169 (CDR1 of VH3-M73), CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 170 (CDR2 of VH3-M73), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 171 (CDR3 of VH3-M73);

(E) a light chain variable region that comprises CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 172 (CDR1 of VL3), CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:

173 (CDR2 of VL3), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 79 (CDR3 of VL3);

(F) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (D) and the light chain variable region of (E);

5 (G) a heavy chain variable region that comprises CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 169 (CDR1 of VH4-M73), CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 174 (CDR2 of VH4-M73), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 171 (CDR3 of VH4-M73);

(H) a light chain variable region that comprises CDR1 comprising the amino acid sequence of  
10 SEQ ID NO: 175 (CDR1 of VL1), CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 173 (CDR2 of VL1), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 79 (CDR3 of VL1); and

(I) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (G) and the light chain variable region of (H).

15 Furthermore, the present invention provides anti-IL-6 receptor antibodies of any of the following:

(a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 159 (H96-IgG1 variable region);

(b) an antibody that comprises a heavy chain variable region in which at least one of amino acids  
20 of Trp at position 35, Tyr at position 51, Ser at position 63, Lys at position 65, Gly at position 66, Val at position 99, Ile at position 103, Tyr at position 108, Glu at position 111, and Thr at position 113 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 159 (H96-IgG1 variable region) has been substituted with another amino acid;

(c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence  
25 in which Lys at position 65, Gly at position 66, Val at position 99, Ile at position 103, Glu at position 111, and Thr at position 113 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 159 (H96-IgG1 variable region) have been substituted with other amino acids;

(d) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence in which Trp at position 35, Tyr at position 51, Ser at position 63, Lys at position 65, Gly at  
30 position 66, Val at position 99, Ile at position 103, and Tyr at position 108 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 159 (H96-IgG1 variable region) have been substituted with other amino acids;

(e) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 160 (F2H-IgG1 variable region);

35 (f) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 161 (VH5-M83 variable region);



- (g) an antibody that comprises a light chain variable region comprising an amino acid sequence in which Gln at position 27 and/or His at position 55 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23 (PF1L) have been substituted with other amino acids;
- (h) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 162 (L39 variable region);
- (i) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 163 (VL5-kappa variable region);
- (j) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 176 (VH3-M73 variable region);
- (k) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 178 (VH4-M73 variable region);
- (l) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 177 (VL3-kappa variable region);
- (m) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 179 (VL1-kappa variable region);
- (n) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (e) and the light chain variable region of (h);
- (o) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (f) and the light chain variable region of (i) (combination of FV5-M83 variable regions);
- (p) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (j) and the light chain variable region of (l) (combination of FV4-M73 variable regions); and
- (q) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (k) and the light chain variable region of (m) (combination of FV3-M73 variable regions).

The type of amino acid after substitution is not particularly limited in the amino acid substitution of the heavy chain variable regions of (a) to (d) above; however, substitutions of Val for Trp at position 35, Phe for Tyr at position 51, Thr for Ser at position 63, Gln for Lys at position 65, Asp for Gly at position 66, Leu for Val at position 99, Ala for Ile at position 103, Val for Tyr at position 108, Gln for Glu at position 111, Ile for Thr at position 113 are preferred. Alternatively, the type of amino acid after substitution is not particularly limited in the amino acid substitution of the light chain variable region of (g) above; however, substitutions of Glu for Gln at position 27 and Glu for His at position 55 are preferred. Amino acid substitutions, deletions, insertions, and/or additions other than the amino acid substitution described above may be included.

The antibody constant regions of the present invention are not particularly limited, and any constant regions may be used. For example, constant regions comprising a natural sequence such as IgG1, IgG2, and IgG4 and altered constant regions prepared by introducing

amino acid substitutions, deletions, additions, and/or insertions into a constant region comprising a natural sequence can be used. The examples of such altered constant regions include the constant regions described below.

The examples of antibodies using the variable regions of the present invention mentioned above include:

- (1) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 134 (H96-IgG1);
  - (2) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 135 (F2H-IgG1);
  - 10 (3) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 137 (VH5-IgG1);
  - (4) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 139 (VH5-M83);
  - (5) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID  
15 NO: 136 (L39);
  - (6) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 138 (VL5-kappa);
  - (7) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 180 (VH3-M73);
  - 20 (8) an antibody that comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 182 (VH4-M73);
  - (9) an antibody that comprises a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 181 (VL3-kappa);
  - (10) an antibody that comprises a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID  
25 NO: 183 (VL1-kappa);
  - (11) an antibody that comprises the heavy chain of (2) and the light chain of (5);
  - (12) an antibody that comprises the heavy chain of (3) and the light chain of (6);
  - (13) an antibody that comprises the heavy chain of (4) and the light chain of (6) (FV5-M83);
  - (14) an antibody that comprises the heavy chain of (7) and the light chain of (9) (FV4-M73);
  - 30 (15) an antibody that comprises the heavy chain of (8) and the light chain of (10) (FV3-M73);
- and
- (16) an antibody having an activity equivalent to that of any of the antibodies of (1) to (15).

Herein, “having equivalent activity” means that the antigen binding activity and/or neutralizing activity are equivalent. “Equivalent activity” in the present invention does not  
35 necessarily mean completely identical activity, but may be, for example, 50% or more of the activity, preferably 70% or more, and more preferably 90% or more.

Furthermore, the present invention provides CDR and FR of any of the following:

- (i) a heavy chain FR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 84 (heavy chain FR1 of VH5);
- (ii) a heavy chain FR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 186 (heavy chain  
5 FR1 of VH3 and VH4);
- (iii) a heavy chain FR2 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 85 (heavy chain FR2 of VH3, VH4, and VH5);
- (iv) a heavy chain FR3 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 184 (heavy chain FR3 of VH3, VH4, and VH5);
- 10 (v) a heavy chain FR4 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 133 (heavy chain FR4 of VH3, VH4, and VH5);
- (vi) a light chain FR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 92 (light chain FR1 of VL1, VL3, and VL5);
- (vii) a light chain FR2 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 93 (light chain  
15 FR2 of VL1, VL3, and VL5);
- (viii) a light chain FR3 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 97 (light chain FR3 of VL1, VL3, and VL5);
- (ix) a light chain FR4 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 98 (light chain FR4 of VL1, VL3, and VL5);
- 20 (x) a heavy chain CDR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 169 (heavy chain CDR1 of VH3 and VH4);
- (xi) a heavy chain CDR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 165 (heavy chain CDR1 of VH5);
- (xii) a heavy chain CDR2 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 170 (heavy  
25 chain CDR2 of VH3);
- (xiii) a heavy chain CDR2 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 174 (heavy chain CDR2 of VH4);
- (xiv) a heavy chain CDR2 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 166 (heavy chain CDR2 of VH5);
- 30 (xv) a heavy chain CDR3 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 171 (heavy chain CDR3 of VH3 and VH4);
- (xvi) a heavy chain CDR3 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 167 (heavy chain CDR3 of VH5);
- (xvii) a light chain CDR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 175 (light  
35 chain CDR1 of VL1);
- (xviii) a light chain CDR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 172 (light

chain CDR1 of VL3);

(xix) a light chain CDR1 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 101 (light chain CDR1 of VL5);

(xx) a light chain CDR2 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 173 (light chain CDR2 of VL1 and VL3);

(xxi) a light chain CDR2 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 168 (light chain CDR2 of VL5); and

(xxii) a light chain CDR3 that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 79 (light chain CDR3 of VL1, VL3, and VL5).

10           The antibodies of the present invention also include fragments and processed products of antibodies comprising any of the amino acid substitutions described above. Such antibody fragments include, for example, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, single chain Fv (scFv) in which H and L chains are linked together via an appropriate linker, single domain H chain and single domain L chain (for example, Nat. Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126-36), Unibody (WO 2007059782 A1),  
15 and SMIP (WO 2007014278 A2). The origin of antibodies is not particularly limited. The antibodies include human, mouse, rat, and rabbit antibodies. The antibodies of the present invention may be chimeric, humanized, fully humanized antibodies, or such.

              Specifically, such antibody fragments are obtained by treating antibodies with an enzyme, for example, papain or pepsin, or by constructing genes to encode such antibody  
20 fragments, inserting them into expression vectors, and then expressing them in appropriate host cells (see, for example, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Plückthun, A.; Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66; Bird, R. E. *et al.*,  
25 TIBTECH (1991) 9, 132-137).

              scFv is obtained by linking V regions of antibody H and L chains. In such scFv, the H chain V region is linked to the L chain V region via a linker, preferably a peptide linker (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). The H chain and L chain V regions in an scFv may be derived from any of the antibodies described above. The peptide  
30 linker to link the V regions includes, for example, arbitrary single chain peptides of 12 to 19 amino acid residues.

<Antibody constant regions>

              The present invention also provides the antibody constant regions of (i) to (xxi) described below, which have been improved through amino acid substitution. The constant  
35 region refers to IgG1, IgG2, or IgG4 type constant region. The amino acid sequences of human IgG1, IgG2, and IgG4 constant regions are known (human IgG1 constant region, SEQ ID NO:



19; human IgG2 constant region, SEQ ID NO: 20; and human IgG4 constant region, SEQ ID NO: 21). The sequence of human IgG4 constant region has been altered to improve the stability of the hinge region (Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8). The present invention also provides antibodies that comprise such an amino acid substitution-containing antibody constant  
5 region. The antibody constant regions are preferably human antibody constant regions.

The amino acid substitution-containing antibody constant regions of the present invention may comprise other amino acid substitutions or modifications as long as they comprise the amino acid substitution of any one of (i) to (xxi) described below. Therefore, IgG2 constant regions comprising the amino acid substitutions of the present invention in the IgG2 constant  
10 region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 include IgG2 constant regions that comprise one or more amino acid substitutions and/or modifications in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 and further comprise the amino acid substitutions of the present invention, as well as IgG2 constant regions that comprise the amino acid substitutions of the present invention and further comprise one or more amino acid substitutions and/or  
15 modifications. The same applies to IgG1 constant regions comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19 and IgG4 constant regions comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21.

Furthermore, the sugar chain at position 297 in the EU numbering system (see sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242) may be of any  
20 sugar-chain structure, or there may not be any sugar chain linked at this site (for example, constant regions produced in host cells where glycosylation does not occur, such as *E. coli*).

(i) Improvement of the stability of IgG2 constant region at acidic conditions

In an embodiment, the IgG2 constant region of the present invention comprising amino acid substitutions includes IgG2 constant regions in which Met at position 276 (position 397 in  
25 the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 has been substituted with another amino acid. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Val is preferred. The antibody stability under acidic conditions can be improved by substituting Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid.

30 (ii) Improvement of the heterogeneity of IgG2 constant region

In an embodiment, the IgG2 constant region of the present invention comprising amino acid substitutions includes IgG2 constant regions in which Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), and Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ  
35 ID NO: 20 have been substituted with other amino acids. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Cys at position 14

(position 131 in the EU numbering system), Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), and Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) (IgG2-SKSC) are preferred.

These substitutions can reduce the heterogeneity originated from the hinge region of IgG2. The IgG2 constant regions of the present invention comprising amino acid substitutions include IgG2 constant regions comprising at least one of the three types of amino acid substitutions described above; however, the IgG2 constant regions preferably comprise substitutions of Cys at position 14 and Cys at position 102 with other amino acids or all three types of the amino acid substitutions described above.

(iii) Impairment of the binding of IgG2 constant region to FcγR

In an embodiment, the present invention also provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Ala at position 209 (EU330), Pro at position 210 (EU331), and/or Thr at position 218 (EU339) of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with Ser, Ser, and Ala, respectively. The substitutions for Ala at position 209 (EU330) and for Pro at position 210 (EU331) have already been reported to enable the impairment of the Fcγ receptor binding (Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24). From the perspective of immunogenicity risk, however, these alterations are not preferred because they result in generation of non-human derived peptides that can become T-cell epitopes. However, the Fcγ receptor binding of IgG2 can be reduced by substituting Ala for Thr at position 218 (EU339) at the same time, and the 9-12 amino acid peptides which can become T-cell epitopes are derived from human only.

The IgG2 constant regions of the present invention comprising amino acid substitutions comprise at least one of the three types of amino acid substitutions described above; however, the IgG2 constant regions preferably comprise all three types of the amino acid substitutions described above. In a preferred embodiment, the IgG2 constant regions of the present invention comprising amino acid substitutions include IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Ala at position 209 (EU330), Pro at position 210 (EU331), and Thr at position 218 (EU339) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with Ser, Ser, and Ala, respectively.

(iv) Improvement of the C-terminal heterogeneity of IgG2 constant region

The present invention provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Gly at position 325 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20. The heterogeneity originated from the C terminus of antibody H chain can be reduced only when both of the amino acids are deleted.

(v) Improvement of the pharmacokinetics by altering IgG2 constant region

An embodiment of the IgG2 constant regions with amino acid substitutions of the present invention includes IgG2 constant regions in which His at position 147 (position 268 in the EU numbering system), Arg at position 234 (position 355 in the EU numbering system), and Gln at position 298 (position 419 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids. These amino acid substitutions enable to improve antibody pharmacokinetics. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Gln for His at position 147 (position 268 in the EU numbering system), Gln for Arg at position 234 (position 355 in the EU numbering system), and Glu for Gln at position 298 (position 419 in the EU numbering system) are preferred. The IgG2 constant regions with amino acid substitutions of the present invention include IgG2 constant regions comprising at least one of the three types of the amino acid substitutions described above; however, the IgG2 constant regions preferably comprise all three types of the amino acid substitutions described above.

(vi) Improvement of the stability of IgG4 constant region at acidic conditions

The present invention provides IgG4 constant regions comprising an amino acid sequence in which Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system) of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 has been substituted with another amino acid. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Lys is preferred. The antibody stability under acidic conditions can be improved by substituting Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 with another amino acid.

(vii) Improvement of the C-terminal heterogeneity of IgG4 constant region

The present invention provides IgG4 constant regions comprising an amino acid sequence in which Gly at position 326 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 327 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21. The heterogeneity originated from the C terminus of antibody H chain can be reduced only when both of the amino acids are deleted.

(viii) Improvement of the C-terminal heterogeneity of IgG1 constant region

The present invention provides IgG1 constant regions comprising an amino acid sequence in which Gly at position 329 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 330 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19. The heterogeneity originated from the C terminus of antibody H chain can be reduced only when both of the amino acids are deleted.

(ix)

The present invention provides IgG1 constant regions comprising an amino acid sequence in which Asn at position 317 (position 434 in the EU numbering system) in the amino

acid sequence of SEQ ID NO: 19 has been substituted with another amino acid.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred.

(x)

5           The present invention provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Ala at position 209 (position 330 in the EU numbering system), Pro at position 210 (position 331 in the EU numbering system), Thr at position 218 (position 339 in the EU numbering system), Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system), Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids.

15           The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Ala at position 209, Ser for Pro at position 210, Ala for Thr at position 218, Val for Met at position 276, Ser for Cys at position 14, Lys for Arg at position 16, Ser for Cys at position 102, Gly for Glu at position 20, and Gly for Ser at position 21 are preferred.

(xi)

20           The present invention provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Ala at position 209 (position 330 in the EU numbering system), Pro at position 210 (position 331 in the EU numbering system), Thr at position 218 (position 339 in the EU numbering system), Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system), Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) have been substituted with other amino acids, and simultaneously Gly at position 325 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

30           The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Ala at position 209, Ser for Pro at position 210, Ala for Thr at position 218, Val for Met at position 276, Ser for Cys at position 14, Lys for Arg at position 16, Ser for Cys at position 102, Gly for Glu at position 20, and Gly for Ser at position 21 are preferred.

(xii)

35           The present invention provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system), Cys at



position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Val for Met at position 276, Ser for Cys at position 14, Lys for Arg at position 16, Ser for Cys at position 102, Gly for Glu at position 20, and Gly for Ser at position 21 are preferred.

(xiii)

The present invention provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system), Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) have been substituted with other amino acids, and simultaneously Gly at position 325 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Val for Met at position 276, Ser for Cys at position 14, Lys for Arg at position 16, Ser for Cys at position 102, Gly for Glu at position 20, and Gly for Ser at position 21 are preferred.

(xiv)

The present invention provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system), His at position 147 (position 268 in the EU numbering system), Arg at position 234 (position 355 in the EU numbering system), and Gln at position 298 (position 419 in the EU numbering system) have been substituted with other amino acids, and simultaneously Gly at position 325 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Cys at position 14, Lys for Arg at position 16, Ser for Cys at position 102,

Gly for Glu at position 20, Gly for Ser at position 21, Gln for His at position 147, Gln for Arg at position 234, and Glu for Gln at position 298 are preferred.

(xv)

5 The present invention provides IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system), His at position 147 (position 268 in the EU numbering system), Arg at position 234 (position 355 in the EU numbering system), Gln at  
10 position 298 (position 419 in the EU numbering system), and Asn at position 313 (position 434 in the EU numbering system) have been substituted with other amino acids, and simultaneously Gly at position 325 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

15 The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Cys at position 14, Lys for Arg at position 16, Ser for Cys at position 102, Gly for Glu at position 20, Gly for Ser at position 21, Gln for His at position 147, Gln for Arg at position 234, Glu for Gln at position 298, and Ala for Asn at position 313 are preferred.  
(xvi)

20 The present invention provides IgG4 constant regions comprising an amino acid sequence in which Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system), Cys at position 14, Arg at position 16, Glu at position 20, Ser at position 21, Arg at position 97, Ser at position 100, Tyr at position 102, Gly at position 103, Pro at position 104, and Pro at position 105 (positions 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221, and 222 in the EU numbering system,  
25 respectively), Glu at position 113, Phe at position 114, and Leu at position 115 (positions 233, 234, and 235 in the EU numbering system, respectively) have been substituted with other amino acids, and simultaneously Gly at position 116 (position 236 in the EU numbering system) has been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however,  
30 substitutions of Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system), Thr for Arg at position 97 (position 214 in the EU numbering system), Arg for Ser at position 100 (position 217 in the EU numbering system), Ser for Tyr at position 102  
35 (position 219 in the EU numbering system), Cys for Gly at position 103 (position 220 in the EU numbering system), Val for Pro at position 104 (position 221 in the EU numbering system), Glu

for Pro at position 105 (position 222 in the EU numbering system), Pro for Glu at position 113 (position 233 in the EU numbering system), Val for Phe at position 114 (position 234 in the EU numbering system), Ala for Leu at position 115 (position 235 in the EU numbering system), and Lys for Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system) are preferred.

5 (xvii)

The present invention provides IgG4 constant regions comprising an amino acid sequence in which Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system), Cys at position 14, Arg at position 16, Glu at position 20, Ser at position 21, Arg at position 97, Ser at position 100, Tyr at position 102, Gly at position 103, Pro at position 104, and Pro at position 105 (positions 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221, and 222 in the EU numbering system, respectively), Glu at position 113, Phe at position 114, and Leu at position 115 (positions 233, 234, and 235 in the EU numbering system, respectively) have been substituted with other amino acids, and simultaneously Gly at position 116 (position 236 in the EU numbering system), Gly at position 326 (position 446 in the EU numbering system), and Lys at position 327 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system), Thr for Arg at position 97 (position 214 in the EU numbering system), Arg for Ser at position 100 (position 217 in the EU numbering system), Ser for Tyr at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Cys for Gly at position 103 (position 220 in the EU numbering system), Val for Pro at position 104 (position 221 in the EU numbering system), Glu for Pro at position 105 (position 222 in the EU numbering system), Pro for Glu at position 113 (position 233 in the EU numbering system), Val for Phe at position 114 (position 234 in the EU numbering system), Ala for Leu at position 115 (position 235 in the EU numbering system), and Lys for Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system) are preferred.

(xviii)

The present invention provides IgG1 constant regions comprising an amino acid sequence in which Asn at position 317 (position 434 in the EU numbering system) has been substituted with another amino acid, and simultaneously Gly at position 329 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 330 (position 447 in the EU numbering system) have been deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19.

The type of amino acid after substitution of Asn at position 317 (position 434 in the EU numbering system) is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred.

(xix)

Below is a preferred embodiment of IgG2 of the present invention, which has reduced heterogeneity in the hinge region and/or reduced Fcγ receptor-binding activity.

Antibodies comprising an IgG2 constant region comprising an amino acid sequence in which Ala at position 209, Pro at position 210, Thr at position 218, Cys at position 14, Arg at position 16, Cys at position 102, Glu at position 20, and Ser at position 21 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Ala at position 209 (position 330 in the EU numbering system), Ser for Pro at position 210 (position 331 in the EU numbering system), Ala for Thr at position 218 (position 339 in the EU numbering system), Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) are preferred.

Such IgG2 constant regions include, for example, IgG2 constant regions comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 191 (M86).

In another preferred embodiment, IgG2 constant regions of the present invention include IgG2 constant regions resulting from the deletion of Gly at position 325 and Lys at position 326 in the above-described IgG2 constant regions to reduce C-terminal heterogeneity. Such antibodies include, for example, IgG2 that comprises a constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 192 (M86ΔGK).

(xx)

Below is another preferred embodiment of the IgG2 constant regions of the present invention, which have reduced heterogeneity in the hinge region.

IgG2 constant regions comprising an amino acid sequence in which Cys at position 14, Arg at position 16, Cys at position 102, Glu at position 20, and Ser at position 21 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 have been substituted with other amino acids.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) are preferred.

Such IgG2 constant regions include, for example, IgG2 constant regions comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 193 (M40).

In another preferred embodiment, the IgG2 constant regions of the present invention



include IgG2 constant regions further comprising the deletion of Gly at position 325 and Lys at position 326 in the above-described IgG2 constant regions. Such antibodies include, for example, IgG2 constant regions comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 194 (M40ΔGK).

5 (xxi) M14ΔGK, M17ΔGK, M11ΔGK, M31ΔGK, M58, M73, M83, M86ΔGK, and M40ΔGK

The present invention also provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 24 (M14ΔGK). The present invention also provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 116 (M17ΔGK). The present invention also provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 25 (M11ΔGK). The present invention further provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 118 (M31ΔGK). The present invention further provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 151 (M58). The present invention further provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 153 (M73). The present invention also provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 164 (M83). The present invention further provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 192 (M86ΔGK). The present invention further provides an antibody constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 194 (M40ΔGK). These antibody constant regions have been optimized to have reduced Fcγ receptor binding activity, reduced immunogenicity risk, improved stability under acidic conditions, reduced heterogeneity, improved pharmacokinetics, and/or higher stability in preparations in comparison with the IgG1 constant region.

The present invention provides antibodies comprising the antibody constant region of any one of (i) to (xxi) described above. There is no limitation on the type of antigen and origin of antibody, as long as the antibodies comprise an antibody constant region described above. The preferred antibodies include, for example, antibodies that bind to IL-6 receptor. Alternatively, the preferred antibodies include, for example, humanized antibodies. Such antibodies include, for example, antibodies comprising the variable region of humanized PM-1 antibody. Such a variable region of humanized PM-1 antibody may comprise any of the above-described amino acid substitutions, or other amino acid substitutions, deletions, additions, and/or insertions. Specifically, the substitutions include, for example, alterations that improve the affinity of (a) to (y) described above; alterations that lower the isoelectric point of (i) to (viii) described above, alternations that improve the stability of (α) to (ζ) described below; and alternations that reduce immunogenicity, but are not limited thereto.

35 In one embodiment, such antibodies include antibodies that comprise a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 113 (PF\_1+M14ΔGK) and

a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23 (PF1\_L) (the light chain constant region may be kappa or lambda, or an altered form thereof) (PF1), but are not limited thereto.

Alternatively, the antibody constant regions described above and/or antibody molecules comprising an antibody constant region described above can be linked as a form of Fc fusion molecule to antibody-like binding molecule (scaffold molecules), bioactive peptides, binding peptides, or such.

The antibodies of the present invention can also be obtained by, for example, the following methods in addition to those described in the Examples. In one embodiment to obtain antibodies of the present invention, one or more amino acid residues are first substituted with amino acids of interest in at least one region selected from the group consisting of CDR, FR, and constant regions of an anti-IL-6 receptor antibody known to those skilled in the art.

Methods for obtaining anti-IL-6 receptor antibodies known to those skilled in the art are not limited. Methods for substituting one or more amino acid residues with amino acids of interest in at least one region selected from the group consisting of the CDR, FR, and constant regions include, for example, site-directed mutagenesis (Hashimoto-Gotoh, T., Mizuno, T., Ogasahara, Y., and Nakagawa, M. An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* (1995) 152, 271-275; Zoller, M. J., and Smith, M. Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* (1983) 100, 468-500; Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H. W., Kramer, B., Pflugfelder, M., and Fritz, H. J. The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* (1984) 12, 9441-9456; Kramer W., and Fritz H. J. Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* (1987) 154, 350-367; Kunkel, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 488-492). These methods can be used to substitute target amino acids in antibodies with amino acids of interest. Methods for substituting amino acids include library technologies such as framework shuffling (*Mol. Immunol.* 2007 Apr;44(11): 3049-60) and CDR repair (US2006/0122377). Using these methods, amino acids can be substituted into appropriate frameworks and CDRs.

In another embodiment to obtain antibodies, an antibody that binds to IL-6 receptor is first prepared by methods known to those skilled in the art. When the prepared antibody is derived from a nonhuman animal, it can be humanized. Then, the prepared antibody is tested to assess whether it has neutralizing activity by using methods known to those skilled in the art. The binding activity and neutralizing activity of antibodies can be determined, for example, by the methods described in the Examples; however, such methods are not limited thereto. Next, one or more amino acid residues in at least one selected from the group consisting of CDR, FR,

and constant regions of antibody are substituted with amino acids of interest.

More specifically, the present invention relates to methods for producing antibodies with improved neutralizing activity, binding activity, or stability, or reduced immunogenicity, which comprise the steps of:

- 5 (a) expressing a DNA encoding an H chain in which one or more amino acid residues in at least one region selected from the group consisting of CDR, FR, and constant regions are substituted with amino acids of interest, and a DNA encoding an L chain in which one or more amino acid residues in at least one region selected from the group consisting of CDR and FR regions are substituted with amino acids of interest; and
- 10 (b) collecting the expression products of step (a).

The first step of the production methods of the present invention is expressing a DNA encoding a mutant anti-IL-6 receptor antibody H chain in which one or more amino acid residues in at least one region selected from the group consisting of CDR, FR, and constant regions are substituted with amino acids of interest, and a DNA encoding an anti-IL-6 receptor antibody L  
15 chain in which one or more amino acid residues in at least one region selected from the group consisting of CDR and FR regions are substituted with amino acids of interest. A DNA encoding an H chain in which one or more amino acid residues in at least one region selected from the group consisting of CDR, FR, and constant regions are substituted with amino acids of interest can be prepared, for example, by obtaining a DNA encoding the CDR, FR, or constant  
20 region of a wild type H chain, and introducing an appropriate substitution so that a codon encoding a particular amino acid in at least one selected from the group consisting of the CDR, FR, and constant regions encodes an amino acid of interest. Furthermore, a DNA encoding an L chain in which one or more amino acid residues in at least one selected from the group consisting of CDR and FR regions are substituted with amino acids of interest can be prepared,  
25 for example, by obtaining a DNA encoding the CDR and/or FR regions of a wild type L chain and introducing an appropriate substitution so that a codon encoding a particular amino acid in the CDR and/or FR regions encodes an amino acid of interest.

Alternatively, a DNA encoding an H chain in which one or more amino acid residues in at least one selected from the group consisting of CDR, FR, and constant regions are substituted  
30 with amino acids of interest can also be prepared by designing and then chemically synthesizing a DNA encoding a protein in which one or more amino acid residues in at least one selected from the group consisting of CDR, FR, and constant regions of the wild type H chain are substituted with amino acids of interest. Furthermore, a DNA encoding an L chain in which one or more amino acid residues in the CDR and/or FR regions are substituted with amino acids  
35 of interest can also be prepared by designing and then chemically synthesizing a DNA encoding a protein in which one or more amino acid residues in the CDR and/or FR regions of a wild type



L chain are substituted with amino acids of interest.

The type of amino acid substitution includes the substitutions described herein, but is not limited thereto.

Alternatively, a DNA encoding an H chain in which one or more amino acid residues in  
5 at least one region selected from the group consisting of CDR, FR, and constant regions are substituted with amino acids of interest can also be prepared as a combination of partial DNAs. Such combinations of partial DNAs include, for example, the combination of a DNA encoding a variable region and a DNA encoding a constant region, and the combination of a DNA encoding an Fab region and a DNA encoding an Fc region, but are not limited thereto. A DNA encoding  
10 an L chain can also be prepared as a combination of partial DNAs.

Methods for expressing the above-described DNAs include the methods described below. For example, an H chain expression vector is constructed by inserting a DNA encoding an H chain variable region into an expression vector along with a DNA encoding an H chain constant region. Likewise, an L chain expression vector is constructed by inserting a DNA  
15 encoding an L chain variable region into an expression vector along with a DNA encoding an L chain constant region. Alternatively, these H and L chain genes may be inserted into a single vector. Expression vectors include, for example, SV40 virus-based vectors, EB virus-based vectors, and BPV (papilloma virus)-based vectors, but are not limited thereto.

Host cells are co-transformed with an antibody expression vector constructed by the  
20 methods described above. Such host cells include the above-described cells such as CHO (Chinese hamster ovary) cells as well as microorganisms such as *E. coli*, yeast, and *Bacillus subtilis*, and plants and animals (Nature Biotechnology (2007) 25, 563-565; Nature Biotechnology (1998) 16, 773-777; Biochemical and Biophysical Research Communications (1999) 255, 444-450; Nature Biotechnology (2005) 23, 1159-1169; Journal of Virology (2001)  
25 75, 2803-2809; Biochemical and Biophysical Research Communications (2003) 308, 94-100). The transformation can be preferably achieved by using electroporation, the lipofectin method (R. W. Malone *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 6077; P. L. Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84, 7413), calcium phosphate method (F. L. Graham & A. J. van der Eb, Virology (1973) 52, 456-467), DEAE-Dextran method, and the like.

30 In the next step of antibody production, the expression products obtained in step (a) are collected. The expression products can be collected, for example, by culturing the transformants and then separating the products from the transformed cells or culture media. Separation and purification of antibodies can be achieved by an appropriate combination of methods such as centrifugation, ammonium sulfate fractionation, salting out, ultrafiltration,  
35 columns of 1q, FcRn, Protein A, and Protein G, affinity chromatography, ion exchange chromatography, and gel filtration chromatography.



Those skilled in the art can appropriately prepare the constant regions of the present invention according to the methods for preparing antibodies.

The present invention further relates to methods for enhancing the activity of an anti-IL-6 receptor antibody to bind or neutralize an IL-6 receptor, which comprise at least one step selected from the group consisting of:

- (A) substituting Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (HCDR1) with another amino acid;
- (B) substituting Trp at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (HCDR1) with another amino acid;
- 10 (C) substituting Tyr at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) with another amino acid;
- (D) substituting Thr at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) with another amino acid;
- (E) substituting Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) with another amino acid;
- 15 (F) substituting Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with another amino acid;
- (G) substituting Leu at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with another amino acid;
- 20 (H) substituting Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with another amino acid;
- (I) substituting Ala at position 7 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with another amino acid;
- (J) substituting Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with another amino acid;
- 25 (K) substituting Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with other amino acids;
- (L) substituting Leu at position 2, Ala at position 7, and Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with other amino acids;
- 30 (M) substituting Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) with another amino acid;
- (N) substituting Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) with another amino acid;
- (O) substituting Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) with another amino acid;
- 35 (P) substituting Asn at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) with

another amino acid;

(Q) substituting Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2) with another amino acid;

5 (R) substituting Gln at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) with another amino acid;

(S) substituting Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) with another amino acid;

(T) substituting Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) and Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) with other amino acids;

10 (U) substituting Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) with another amino acid;

(V) substituting Gln at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) with other amino acids; and

15 (W) substituting Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2), and Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) with other amino acids; or

(X) a step comprising (V) and (W).

20 In (A) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Trp, Thr, Asp, Asn, Arg, Val, Phe, Ala, Gln, Tyr, Leu, His, Glu, or Cys is preferred.

In (B) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Ile or Val is preferred.

In (C) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Phe is preferred.

25 In (D) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Arg is preferred.

In (E) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Ser or Asn is preferred.

30 In (F) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Ile, Val, Thr, or Leu is preferred.

In (G) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Thr is preferred.

35 In (H) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Ala, Ile, or Ser is preferred. Other preferred substitutions include substitution of Ser for Thr at position 5.

In (I) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Ser or Val is preferred.

In (J) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Leu is preferred.

5 In (K) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitutions of Leu for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5 are preferred. Other preferred substitutions include those of Val for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5; Ile for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5; Thr for Ser at position 1 and Ala for Thr at position 5; Val for Ser at position 1 and  
10 Ile for Thr at position 5; Ile for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5; Thr for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5; and Leu for Ser at position 1 and Ile for Thr at position 5.

In (L) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution of Thr for Leu at position 2, Val for Ala at position 7, and Leu for Met at position 8 are preferred.

15 In (M) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Phe is preferred.

In (N) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Arg or Thr is preferred.

20 In (O) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Phe is preferred.

In (P) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Ser is preferred.

In (Q) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Gly is preferred.

25 In (R) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Gly, Asn, or Ser is preferred.

In (S) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Ser is preferred.

30 In (T) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitutions of Phe for Tyr in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) and Ser for Gly in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) are preferred.

In (U) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitution to Arg or Ser is preferred.

35 In (V) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the affinity is improved; however, substitutions of Gly for Gln at position 1

and Ser for Thr at position 5 are preferred. Other preferred substitutions include those of Gly for Gln at position 1 and Arg for Thr at position 5.

In (W) described above, substitution of Asn for Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) is preferred. The preferred combinations of amino acids after substitution for Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 (HCDR3) include Leu and Ala, Val and Ala, Ile and Ala, Thr and Ala, Val and Ile, Ile and Ile, Thr and Ile, and Leu and Ile.

In the steps of (A) to (X) above, the method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples. When an amino acid is substituted in a heavy chain variable region, the original amino acid sequence of the heavy chain variable region before substitution is preferably an amino acid sequence of the heavy chain variable region of a humanized PM-1 antibody. Alternatively, when an amino acid is substituted in a light chain variable region, the original amino acid sequence of the light chain variable region before substitution is preferably an amino acid sequence of the light chain variable region of a humanized PM-1 antibody. Furthermore, it is preferable to introduce the amino acid substitutions of steps (A) to (X) described above into the humanized PM-1 antibody.

The methods of the present invention for enhancing the binding or neutralizing activity of an anti-IL-6 receptor antibody comprise at least any one of the steps of (A) to (X) described above. Specifically, the methods of the present invention may comprise two or more of the steps of (A) to (X) described above. Furthermore, the methods of the present invention may comprise other steps (for example, amino acid substitutions, deletions, additions and/or insertions other than those of (A) to (X) described above) as long as they comprise any one of the steps of (A) to (X) described above. Furthermore, for example, FR may comprise amino acid substitutions, deletions, additions and/or insertions, and the constant region may comprise amino acid substitutions, deletions, additions and/or insertions. It is preferable to introduce the amino acid substitutions described above into the humanized PM-1 antibody.

<Methods for reducing the immunogenicity risk of an anti-IL-6 receptor antibody>

The present invention also relates to methods for reducing the immunogenicity of an anti-IL-6 receptor antibody, which comprise the step of substituting Gly for Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2). The methods of the present invention for reducing the immunogenicity of an anti-IL-6 receptor antibody may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of substituting Gly for Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2). The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.



It is preferable to introduce the amino acid substitutions described above into the humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

<Methods for lowering the isoelectric point of an anti-IL-6 receptor antibody>

- 5           The present invention also relates to methods for lowering the isoelectric point of an anti-IL-6 receptor antibody, which comprise at least one step selected from the group consisting of:
- (i) substituting Gln at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 (HFR1) with another amino acid;
  - 10   (ii) substituting Arg at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 (HFR2) with another amino acid;
  - (iii) substituting Arg at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 (HFR3) with another amino acid;
  - (iv) substituting Gln at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (HFR4) with  
15   another amino acid;
  - (v) substituting Arg at position 18 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 (LFR1) with another amino acid;
  - (vi) substituting Lys at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 (LFR2) with another amino acid;
  - 20   (vii) substituting Gln at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 (LFR3) with another amino acid;
  - (viii) substituting Lys at position 10 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 (LFR4) with another amino acid;
  - (ix) substituting Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (HCDR1) with  
25   another amino acid;
  - (x) substituting Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) with another amino acid;
  - (xi) substituting Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2) with another amino acid;
  - 30   (xii) substituting Arg at position 13 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 (HFR1) with another amino acid;
  - (xiii) substituting Lys at position 15 and/or Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HFR1) or 100 with other amino acids;
  - (xiv) substituting Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 (LCDR1) or  
35   101 with another amino acid; and
  - (xv) substituting His at position 6 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 (LCDR2) or 103

with another amino acid.

In (i) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

5 In (ii) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

In (iii) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Lys is preferred.

In (iv) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

10 In (v) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Ser is preferred.

In (vi) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

15 In (vii) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

In (viii) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

In (ix) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Asp is preferred.

20 In (x) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Gln is preferred.

In (xi) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

25 In (xii) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Lys is preferred.

In (xiii) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitutions to Gln for Lys at position 15 and Asp for Ser at position 16 are preferred.

30 In (xiv) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

In (xv) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the isoelectric point is lowered; however, substitution to Glu is preferred.

35 In the steps of (i) to (xv) described above, the method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples. When an amino acid is substituted in a heavy chain variable region, the original amino acid sequence of the heavy chain

variable region before substitution is preferably an amino acid sequence of the heavy chain variable region of a humanized PM-1 antibody. Alternatively, when an amino acid is substituted in a light chain variable region, the original amino acid sequence of the light chain variable region before substitution is preferably an amino acid sequence of the light chain variable region of a humanized PM-1 antibody. Furthermore, it is preferable to introduce the amino acid substitutions of the steps of (i) to (xv) described above into the humanized PM-1 antibody.

The methods of the present invention for lowering the isoelectric point of an anti-IL-6 receptor antibody comprise at least any one of the steps of (i) to (xv) described above.

Specifically, the methods of the present invention may comprise two or more of the steps of (i) to (xv) described above. Furthermore, the methods of the present invention may comprise other steps (for example, amino acid substitutions, deletions, additions and/or insertions other than those of (i) to (xv) described above) as long as they comprise any one of the steps of (i) to (xv) described above. Furthermore, for example, the constant region may comprise amino acid substitutions, deletions, additions and/or insertions.

#### <Methods for improving the stability of an anti-IL-6 receptor antibody>

The present invention also relates to methods for increasing the stability of an anti-IL-6 receptor antibody, which comprise at least one step selected from the group consisting of:

( $\alpha$ ) substituting Met at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 (HFR3) with another amino acid;

( $\beta$ ) substituting Leu at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 (HFR3) with another amino acid;

( $\gamma$ ) substituting Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) with another amino acid;

( $\delta$ ) substituting Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 (LCDR3) with another amino acid;

( $\epsilon$ ) substituting Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (HCDR2) with another amino acid; and

( $\zeta$ ) substituting Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (FR4) with another amino acid.

In ( $\alpha$ ) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the stability is improved; however, substitution to Ile is preferred.

In ( $\beta$ ) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the stability is improved; however, substitution to Ser is preferred.

In ( $\gamma$ ) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the stability is improved; however, substitution to Asn is preferred.

In ( $\delta$ ) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the stability is improved; however, substitution to Ser is preferred.

In ( $\epsilon$ ) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the stability is improved; however, substitution to Gly is preferred.

5 In ( $\zeta$ ) described above, the type of amino acid after substitution is not particularly limited as long as the stability is improved; however, substitution to Ile is preferred.

In the steps of ( $\alpha$ ) to ( $\zeta$ ) described above, the method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples. When an amino acid is substituted in a heavy chain variable region, the original amino acid sequence of the heavy chain variable region before substitution is preferably an amino acid sequence of the heavy chain variable region of a humanized PM-1 antibody. Alternatively, when an amino acid is substituted in a light chain variable region, the original amino acid sequence of the light chain variable region before substitution is preferably an amino acid sequence of the light chain variable region of a humanized PM-1 antibody. Furthermore, it is preferable to introduce the amino acid substitutions of ( $\alpha$ ) to ( $\zeta$ ) described above into the humanized PM-1 antibody.

The methods of the present invention for improving the stability of an anti-IL-6 receptor antibody comprise at least any one of the steps of ( $\alpha$ ) to ( $\zeta$ ) described above. Specifically, the methods of the present invention may comprise two or more of the steps of ( $\alpha$ ) to ( $\zeta$ ) described above. Furthermore, the methods of the present invention may comprise other steps (for example, amino acid substitutions, deletions, additions and/or insertions other than those of ( $\alpha$ ) to ( $\zeta$ ) described above) as long as they comprise any one of the steps of ( $\alpha$ ) to ( $\zeta$ ) described above. Furthermore, for example, the constant region may comprise amino acid substitutions, deletions, additions and/or insertions.

25 <Methods for reducing the immunogenicity of an anti-IL-6 receptor antibody>

The present invention also relates to methods for reducing the immunogenicity of an anti-IL-6 receptor antibody, in particular, a humanized PM-1 antibody, which comprise the step of substituting Lys for Arg at position 13, Glu for Gln at position 16, Ala for Thr at position 23, and/or Ser for Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 (HFR1). The methods of the present invention for reducing the immunogenicity of an anti-IL-6 receptor antibody may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of substituting Ser for Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 (HFR1).

The present invention further relates to methods for reducing the immunogenicity of an anti-IL-6 receptor antibody, in particular, a humanized PM-1 antibody, which comprise the step of substituting Val for Ala at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 90 (HFR3). The methods of the present invention for reducing the immunogenicity of an anti-IL-6 receptor



antibody may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of substituting Val for Ala at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 90 (HFR3).

The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

The present invention further relates to methods for reducing antibody immunogenicity, which comprise converting the FR3 of an anti-IL-6 receptor antibody, in particular, a humanized PM-1 antibody, H53/L28, or PF1 antibody, into an FR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 128 or 129.

<Methods for improving antibody stability under acidic conditions>

The present invention also relates to methods for improving antibody stability under acidic conditions, which comprise the step of substituting Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (IgG2) with another amino acid. The methods of the present invention for improving antibody stability under acidic conditions may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of substituting Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (IgG2) with another amino acid. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Val is preferred. The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

<Methods for reducing the heterogeneity originated from the hinge region of IgG2 constant region>

The present invention also relates to methods for reducing antibody heterogeneity, which comprise the step of substituting Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), and/or Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (IgG2) with other amino acids. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Cys at position 14, Lys for Arg at position 16, and Ser for Cys at position 102 are preferred. The methods of the present invention for reducing antibody heterogeneity may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of substituting Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), and/or Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20

(IgG2). The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitutions can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples. In the amino acid substitution, all of the three amino acids described above may be substituted or one or two (for example, positions 14 and 102) of them may be substituted.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

<Methods for reducing the heterogeneity originated from deletion of C-terminal amino acids in an IgG2 constant region>

The present invention also relates to methods for reducing antibody heterogeneity, which comprise the step of deleting Gly at position 325 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (position 447 in the EU numbering system) in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20. The methods of the present invention for reducing antibody heterogeneity may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of deleting Gly at position 325 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 326 (position 447 in the EU numbering system) in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20. The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

<Methods for reducing the FcγR binding while maintaining the human sequence in the IgG2 constant region>

The present invention also relates to methods for reducing the FcγR binding of an antibody, which comprise the step of substituting Ser for Ala at position 209 (EU330), Ser for Pro at position 210 (EU331), and Ala for Thr at position 218 (EU339) in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20. The methods of the present invention for reducing the FcγR binding of an antibody may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of substituting Ser for Ala at position 209 (EU330), Ser for Pro at position 210 (EU331), and Ala for Thr at position 218 (EU339) in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20. The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

<Methods for improving the pharmacokinetics by substituting amino acids of IgG2 constant

region>

The present invention also relates to methods for improving the pharmacokinetics of an antibody, which comprise the step of substituting His at position 147 (EU268), Arg at position 234 (EU355), and/or Gln at position 298 (EU419) in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20. The methods of the present invention for improving the pharmacokinetics of an antibody may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the above-described step. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Gln for His at position 147 (EU268), Gln for Arg at position 234 (EU355), and Glu for Gln at position 298 (EU419) are preferred.

The present invention also relates to methods for improving the pharmacokinetics of an antibody, which comprise the step of substituting Asn at position 313 (EU434) in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 or 151 (M58). The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred. The methods of the present invention for improving the pharmacokinetics of an antibody may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the above-described step.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

The present invention also relates to methods for reducing antibody heterogeneity originated from the hinge region of IgG2, methods for improving antibody stability under acidic conditions, methods for reducing antibody heterogeneity originated from C-terminus, and/or methods for reducing the FcγR binding of an antibody, all of which comprise in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (M14ΔGK), the steps of:

(a) substituting Ser for Ala at position 209 (position 330 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(b) substituting Ser for Pro at position 210 (position 331 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(c) substituting Ala for Thr at position 218 (position 339 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(d) substituting Val for Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(e) substituting Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(f) substituting Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(g) substituting Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(h) substituting Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

5 (i) substituting Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20; and

(j) deleting Gly at position 325 and Lys at position 326 (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

10 The methods of the present invention may comprise other steps such as amino acid substitution and deletion, as long as they comprise the steps described above. The methods for amino acid substitution and deletion are not particularly limited. The substitution and deletion can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

15 The type of target antibody is not particularly limited; however, it is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

20 The present invention also relates to methods for reducing the heterogeneity originated from the hinge region of IgG2, methods for improving antibody stability under acidic conditions, and/or methods for reducing antibody heterogeneity originated from C-terminus, all of which comprise in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (M31ΔGK), the steps of:

(a) substituting Val for Met at position 276 (position 397 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

25 (b) substituting Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(c) substituting Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(d) substituting Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

30 (e) substituting Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(f) substituting Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20; and

35 (g) deleting Gly at position 325 and Lys at position 326 (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

The present invention also relates to methods for reducing antibody heterogeneity



originated from the hinge region of IgG2, methods for improving antibody pharmacokinetics, and/or methods for reducing antibody heterogeneity originated from C-terminus, all of which comprise in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (M58), the steps of:

- 5 (a) substituting Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (b) substituting Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (c) substituting Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the
- 10 amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (d) substituting Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (e) substituting Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- 15 (f) substituting Gln for His at position 147 (position 268 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (g) substituting Gln for Arg at position 234 (position 355 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (h) substituting Glu for Gln at position 298 (position 419 in the EU numbering system) in the
- 20 amino acid sequence of SEQ ID NO: 20; and
- (i) deleting Gly at position 325 and Lys at position 326 (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

The present invention also relates to methods for reducing antibody heterogeneity originated from the hinge region of IgG2, methods for improving antibody pharmacokinetics,

25 and/or methods for reducing antibody heterogeneity originated from C-terminus, all of which comprise in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (M73), the steps of:

- (a) substituting Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- 30 (b) substituting Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (c) substituting Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (d) substituting Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system) in the
- 35 amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;
- (e) substituting Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the

amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(f) substituting Gln for His at position 147 (position 268 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(g) substituting Gln for Arg at position 234 (position 355 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(h) substituting Glu for Gln at position 298 (position 419 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20;

(i) substituting Ala for Asn at position 313 (position 434 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20; and

(j) deleting Gly at position 325 and Lys at position 326 (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

The present invention also relates to methods for reducing the heterogeneity originated from the hinge region of IgG2, methods for reducing antibody heterogeneity originated from C-terminus, and/or methods for reducing the FcγR binding of an antibody, all of which comprise, in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (M86ΔGK), the steps of:

(a) substituting Ala at position 209 (position 330 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;

(b) substituting Pro at position 210 (position 331 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;

(c) substituting Thr at position 218 (position 339 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;

(d) substituting Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;

(e) substituting Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;

(f) substituting Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;

(g) substituting Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;

(h) substituting Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid; and

(i) deleting Gly at position 325 and Lys at position 326 (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Ala at position 209 (position 330 in the EU numbering system), Ser for

Pro at position 210 (position 331 in the EU numbering system), Ala for Thr at position 218 (position 339 in the EU numbering system), Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) are preferred.

The present invention further relates to methods for reducing the heterogeneity originated from the hinge region of IgG2 and/or methods for reducing antibody heterogeneity originated from C-terminus, which comprise in an IgG2 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 (M40ΔGK), the steps of:

- (a) substituting Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;
- (b) substituting Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;
- (c) substituting Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;
- (d) substituting Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid;
- (e) substituting Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 with another amino acid; and
- (f) deleting Gly at position 325 and Lys at position 326 (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitutions of Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system), Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system), Ser for Cys at position 102 (position 219 in the EU numbering system), Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system), and Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) are preferred.

The methods of the present invention may comprise other steps such as amino acid substitution and deletion, as long as they comprise the steps described above. The methods for amino acid substitution and deletion are not particularly limited. The substitution and deletion can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

The type of target antibody is not particularly limited; however, it is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

<Methods for improving the stability of an IgG4 constant region under acidic conditions>

The present invention also relates to methods for improving antibody stability under acidic conditions, which comprise the step of substituting Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system) of an IgG4 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8) with another amino acid. The methods of the present invention for improving antibody stability under acidic conditions may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of substituting Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 (human IgG4 constant region) with another amino acid. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Lys is preferred. The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

<Methods for reducing the heterogeneity originated from deletion of C-terminal amino acids in an IgG4 constant region>

The present invention also relates to methods for reducing the heterogeneity of an antibody, which comprise the step of deleting Gly at position 326 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 327 (position 447 in the EU numbering system) in an IgG4 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8). The methods of the present invention for reducing the heterogeneity may comprise other steps of amino acid substitution, as long as they comprise the step of deleting Lys at position 327 (position 447 in the EU numbering system) and/or Gly at position 326 (position 446 in the EU numbering system) in an IgG4 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8). The method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

The present invention also relates to methods for improving the stability under acidic conditions, methods for reducing the heterogeneity originated from C-terminus, and/or methods for reducing the FcγR binding of an antibody, all of which comprise in an IgG4 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8) (M11ΔGK), the steps of:



- (a) substituting Ser for Cys at position 14 (position 131 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (b) substituting Lys for Arg at position 16 (position 133 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- 5 (c) substituting Gly for Glu at position 20 (position 137 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (d) substituting Gly for Ser at position 21 (position 138 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (e) substituting Thr for Arg at position 97 (position 214 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- 10 (f) substituting Arg for Ser at position 100 (position 217 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (g) substituting Ser for Tyr at position 102 (position 219 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- 15 (h) substituting Cys for Gly at position 103 (position 220 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (i) substituting Val for Pro at position 104 (position 221 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (j) substituting Glu for Pro at position 105 (position 222 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- 20 (k) substituting Pro for Glu at position 113 (position 233 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (l) substituting Val for Phe at position 114 (position 234 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- 25 (m) substituting Ala for Leu at position 115 (position 235 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (n) deleting Gly at position 116 (position 236 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21;
- (o) substituting Lys for Arg at position 289 (position 409 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21; and
- 30 (p) deleting Gly at position 236 and Lys at position 237 (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21.

The methods of the present invention may comprise other steps, such as amino acid substitution and deletion, as long as they comprise the steps described above. The method for amino acid substitution and deletion are not particularly limited. The substitution and deletion can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method

described in the Examples.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

5 <Methods for reducing the heterogeneity originated from deletion of C-terminal amino acids in an IgG1 constant region>

The present invention also relates to methods for reducing antibody heterogeneity, which comprise the step of deleting Gly at position 329 (position 446 in the EU numbering system) and Lys at position 330 (position 447 in the EU numbering system) in an IgG1 constant  
10 region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19. The methods of the present invention for reducing antibody heterogeneity may comprise other steps of amino acid substitutions, as long as they comprise the step of deleting Lys at position 330 (position 447 in the EU numbering system) and Gly at position 329 (position 446 in the EU numbering system) in an IgG1 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19. The  
15 method for amino acid substitution is not particularly limited. The substitution can be achieved, for example, by site-directed mutagenesis described above or a method described in the Examples.

<Methods for improving the pharmacokinetics by substituting amino acids of IgG1 constant region>

20 The present invention relates to methods for improving the antibody pharmacokinetics, which comprise the step of substituting Asn at position 317 (EU434) in an IgG1 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19 with another amino acid. The type of amino acid after substitution is not particularly limited; however, substitution to Ala is preferred. The methods of the present invention for improving the pharmacokinetics may comprise other  
25 steps of amino acid substitution, as long as they comprise the above-described step.

The present invention also relates to methods for improving the pharmacokinetics and/or methods for reducing the heterogeneity originated from C-terminus, both of which comprise, in an IgG1 constant region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19 (M83), the steps of:

30 (a) substituting Ala for Asn at position 317 (EU 434) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19; and  
(b) deleting Lys at position 330 (position 447 in the EU numbering system) and Gly at position 329 (position 446 in the EU numbering system) in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19.

The type of target antibody is not particularly limited; however, the antibody is  
35 preferably an anti-human IL-6 receptor antibody, more preferably a humanized PM-1 antibody or a variant thereof comprising substitutions, deletions, and/or insertions.

The constant regions of the present invention described above can be combined with any antibody variable regions, and preferably with variable regions derived from antibodies against human IL-6 receptor. Variable regions of antibodies against human IL-6 receptor include, for example, variable regions of a humanized PM-1 antibody. The variable regions of a humanized PM-1 antibody may not comprise any amino acid substitutions or may comprise substitutions such as those described above.

The present invention provides pharmaceutical compositions comprising an antibody of the present invention. The pharmaceutical compositions of the present invention are useful in treating diseases associated with IL-6, such as rheumatoid arthritis.

The pharmaceutical compositions of the present invention can be formulated, in addition to the antibodies, with pharmaceutically acceptable carriers by known methods. For example, the compositions can be used parenterally, when the antibodies are formulated in a sterile solution or suspension for injection using water or any other pharmaceutically acceptable liquid. For example, the compositions can be formulated by appropriately combining the antibodies with pharmaceutically acceptable carriers or media, specifically, sterile water or physiological saline, vegetable oils, emulsifiers, suspending agents, surfactants, stabilizers, flavoring agents, excipients, vehicles, preservatives, binding agents, and such, by mixing them at a unit dose and form required by generally accepted pharmaceutical implementations. The content of the active ingredient in such a formulation is adjusted so that an appropriate dose within the required range can be obtained.

Sterile compositions for injection can be formulated using vehicles such as distilled water for injection, according to standard protocols.

Aqueous solutions used for injection include, for example, physiological saline and isotonic solutions containing glucose or other adjuvants such as D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride. These can be used in conjunction with suitable solubilizers such as alcohol, specifically ethanol, polyalcohols such as propylene glycol and polyethylene glycol, and non-ionic surfactants such as Polysorbate 80<sup>TM</sup> and HCO-50.

Oils include sesame oils and soybean oils, and can be combined with solubilizers such as benzyl benzoate or benzyl alcohol. These may also be formulated with buffers, for example, phosphate buffers or sodium acetate buffers; analgesics, for example, procaine hydrochloride; stabilizers, for example, benzyl alcohol or phenol; or antioxidants. The prepared injections are typically aliquoted into appropriate ampules.

The administration is preferably carried out parenterally, and specifically includes injection, intranasal administration, intrapulmonary administration, and percutaneous administration. For example, injections can be administered systemically or locally by intravenous injection, intramuscular injection, intraperitoneal injection, or subcutaneous

injection.

Furthermore, the method of administration can be appropriately selected according to the age and symptoms of the patient. A single dose of the pharmaceutical composition containing an antibody or a polynucleotide encoding an antibody can be selected, for example, from the range of 0.0001 to 1,000 mg per kg of body weight. Alternatively, the dose may be, for example, in the range of 0.001 to 100,000 mg/person. However, the dose is not limited to these values. The dose and method of administration vary depending on the patient's body weight, age, and symptoms, and can be appropriately selected by those skilled in the art.

As used herein, the three-letter and single-letter codes for respective amino acids are as follows:

Alanine: Ala (A)

Arginine: Arg (R)

Asparagine: Asn (N)

Aspartic acid: Asp (D)

Cysteine: Cys (C)

Glutamine: Gln (Q)

Glutamic acid: Glu (E)

Glycine: Gly (G)

Histidine: His (H)

Isoleucine: Ile (I)

Leucine: Leu (L)

Lysine: Lys (K)

Methionine: Met (M)

Phenylalanine: Phe (F)

Proline: Pro (P)

Serine: Ser (S)

Threonine: Thr (T)

Tryptophan: Trp (W)

Tyrosine: Tyr (Y)

Valine: Val (V)

All prior art documents cited herein are incorporated by reference in their entirety.

### Examples

Hereinbelow, the present invention is specifically described with reference to the Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.



[Example 1] Improvement of antigen-binding activity through CDR alteration using affinity maturation technology

#### Preparation of SR344

5 A CHO cell line constitutively expressing a sequence of N-terminal 1<sup>st</sup> to 344<sup>th</sup> amino acids of soluble human IL-6R (hereinafter SR344) reported in J. Biochem. (1990) 108, 673-676 (Yamasaki *et al.*, Science (1988) 241, 825-828 (GenBank #X12830)) was prepared.

SR344 was purified from the culture supernatant of SR344-expressing CHO cells using three types of column chromatography: Blue Sepharose 6 FF column chromatography, affinity  
10 chromatography with an SR344-specific antibody-immobilized column, and gel filtration column chromatography.

The culture supernatant was directly loaded onto a Blue Sepharose 6 FF column (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), and the non-adsorbed fraction was thoroughly washed off using the same buffer. Then, the column was  
15 washed with the same buffer containing 300 mM KCl. The adsorbed protein was then eluted using the same buffer in the presence of 300 mM KCl with a linear concentration gradient of 0 to 0.5 M KSCN. Fractions eluted with the KSCN concentration gradient were analyzed by Western blotting using an SR344-specific antibody, and fractions containing SR344 were collected.

20 The SR344-specific antibody-immobilized column was pre-equilibrated with Tris-buffered saline (TBS). The SR344 fraction obtained in the first step was concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra-15 (MILLIPORE; molecular weight cut-off of 10 kDa), and diluted two fold with TBS before it was loaded onto the column. After the column was washed with TBS, the adsorbed protein was eluted with 100 mM glycine-HCl buffer (pH 2.5). The  
25 eluted fractions were neutralized by adding 1 M Tris (pH 8.1). The obtained fractions were analyzed by SDS-PAGE to collect SR344-containing fractions.

The fraction obtained in the second step was concentrated using Amicon Ultra-15 (molecular weight cut-off of 10 kDa) and loaded onto a Superdex 200 column (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrated with PBS. The fraction eluted as the major peak was used as the  
30 final purified sample of SR344.

#### Establishment of a human gp130-expressing BaF3 cell line

A BaF3 cell line expressing human gp130 was established by the procedure described below, to obtain a cell line that proliferates in an IL-6-dependent manner.

35 A full-length human gp130 cDNA (Hibi *et al.*, Cell (1990) 63, 1149-1157 (GenBank #NM\_002184)) was amplified by PCR and cloned into the expression vector pCOS2Zeo to

construct pCOS2Zeo/gp130. pCOS2Zeo is an expression vector constructed by removing the DHFR gene expression region from pCHOI (Hirata *et al.*, FEBS Letter (1994) 356, 244-248) and inserting the expression region of the Zeocin resistance gene. The full-length human IL-6R cDNA was amplified by PCR and cloned into pcDNA3.1(+) (Invitrogen) to construct  
 5 hIL-6R/pcDNA3.1(+).

10  $10\ \mu\text{g}$  of pCOS2Zeo/gp130 was mixed with BaF3 cells ( $0.8 \times 10^7$  cells) suspended in PBS, and then pulsed at 0.33 kV and 950  $\mu\text{FD}$  using Gene Pulser (Bio-Rad). The BaF3 cells having the gene introduced by electroporation were cultured for one whole day and night in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 0.2 ng/ml mouse interleukin-3 (PeproTech)  
 10 and 10% Fetal Bovine Serum (hereinafter FBS; HyClone), and selected by adding RPMI 1640 medium supplemented with 100 ng/ml human interleukin-6 (R&D systems), 100 ng/ml human interleukin-6 soluble receptor (R&D systems), and 10% FBS to establish a human gp130-expressing BaF3 cell line (hereinafter BaF3/gp130). This BaF3/gp130 proliferates in the presence of human interleukin-6 (R&D systems) and SR344, and thus can be used to assess the  
 15 growth inhibition activity (or IL-6 receptor neutralizing activity) of an anti-IL-6 receptor antibody.

#### Construction of a library of altered CDRs

20 First, a humanized PM-1 antibody (Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6) was converted into scFv. The VH and VL regions were amplified by PCR to prepare a humanized PM-1 HL scFv having the linker sequence GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 106) between VH and VL.

25 Two types of libraries were constructed by PCR using the prepared humanized PM-1 HL scFv-encoding DNA as a template. One was a target library where one of the amino acids in a CDR is designed as X, and the other was a library where only the hot spot sequences in a CDR are substituted with random sequences. The target library where one of the amino acids in each CDR is designed as X was constructed as follows. The library portion was constructed by PCR using a primer containing NNS for the amino acids to be incorporated into the library, while the remaining was prepared by standard PCR. The two were linked together by assembly  
 30 PCR. In this construction, only one CDR was diversified as a library (see J. Mol. Biol. (1996) 256, 77-88). Likewise, the library where only the hot spot sequences were substituted with random sequences was constructed by PCR using a primer containing NNS for all hot spot amino acids. In this construction, two libraries were constructed: one was a library where only the hot spot in VH was diversified, and the other was a library where only the hot spot in VL was  
 35 diversified (see Nature Biotechnology 1999 June;17:568-572).

A ribosome display library was constructed using the above-described libraries

according to J. Immunological Methods (1999) 231, 119-135. To perform *in vitro* translation based on the cell-free *E. coli* system, an SDA sequence (ribosome binding site) and T7 promoter were attached to the 5' end and a partial gene3 sequence was ligated as a ribosome display linker to the 3' end using *Sfi*I.

5

#### Selection of high affinity scFv by ribosome display

Ribosome display-based panning was carried out (Nature Biotechnology 2000 Dec;18:1287-1292). The prepared SR344 was biotinylated using NHS-PEO4-Biotin (Pierce) and then used as an antigen. Off-rate selection was performed to obtain high affinity scFv with high efficiency (JBC (2004) 279(18), 18870-18877). The concentrations of biotinylated antigen and competitor antigen were 1 nM and 1  $\mu$ M, respectively. The time of competition in the fourth round was 10 O/N.

10

#### scFv: insertion into phagemid, antigen binding and sequence analysis

PCR was performed to reconstruct HL scFv using the template DNA pool obtained in the fourth round and specific primers. After digestion with *Sfi*I, the fragment was inserted into the phagemid vector pELBG lacI predigested with *Sfi*I. XL1-Blue (Stratagene) was transformed with the resulting construct. Using the yielded colonies, antigen binding was assessed by phage ELISA and the HL scFv sequence was analyzed. The phage ELISA was carried out using plates coated with SR344 at 1  $\mu$ g/ml (J. Mol. Biol. (1992) 227, 381-388). Clones exhibiting SR344 binding were analyzed for their sequences using specific primers.

15

20

#### Conversion of scFv into IgG, and expression and purification of IgG

IgG expression was conducted using animal cell expression vectors. Clones enriched with a particular mutation were subjected to PCR to amplify their VLs and VHs. After *Xho*I/*Nhe*I digestion and *Eco*RI digestion, the amplified DNAs were inserted into an animal cell expression vector. The nucleotide sequence of each DNA fragment was determined using a DNA sequencer (ABI PRISM 3730xL DNA Sequencer or ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the method described in the attached instruction manual.

25

30

#### Expression of IgG-converted antibodies

Antibody expression was performed by the method described below. Human embryonic kidney cancer-derived HEK293H cells (Invitrogen) were suspended in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen). The cells (10-ml/plate; cell density of 5 to 6 x 10<sup>5</sup> cells/ml) were plated on dishes for adherent cells (10 cm in diameter;

35

CORNING) and cultured in a CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for one whole day and night. Then, the medium was removed by aspiration, and 6.9 ml of CHO-S-SFM-II medium (Invitrogen) was added. The prepared plasmid DNA mixture (13.8 µg in total) was combined with 20.7 µl of 1 µg/ml Polyethylenimine (Polysciences Inc.) and 690 µl of CHO-S-SFMII medium. The resulting mixture was incubated at room temperature for 10 minutes, and then added to the cells in each dish. The cells were incubated in a CO<sub>2</sub> incubator (at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>) for 4 to 5 hours. Then, 6.9 ml of CHO-S-SFM-II medium (Invitrogen) was added to the dishes, and the cells were incubated in a CO<sub>2</sub> incubator for three days. The culture supernatants were collected and centrifuged (approx. 2000 g, 5 min, room temperature) to remove the cells, and sterilized through 0.22-µm filter MILLEX<sup>(R)</sup>-GV (Millipore). The samples were stored at 4°C until use.

#### Purification of IgG-converted antibodies

50 µl of rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) suspended in TBS was added to the obtained culture supernatants, and the combined solutions were mixed by inversion at 4°C for four hours or more. The solutions were transferred into 0.22-µm filter cups of Ultrafree<sup>(R)</sup>-MC (Millipore). After washing three times with 500 µl of TBS, the rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> resin was suspended in 100 µl of 50 mM sodium acetate (pH 3.3) aqueous solution, and the mixture was incubated for two minutes to elute the antibody. Immediately, the eluate was neutralized by adding 6.7 µl of 1.5 M Tris-HCl (pH 7.8). Elution was carried out twice, yielding 200 µl of purified antibody. The absorbance at 280 nm was determined using ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) or spectrophotometer DU-600 (BECKMAN) using 2 or 50 µl of the antibody solution, respectively. The antibody concentration was calculated from the obtained value according to the following formula:

$$\text{Antibody concentration (mg/ml)} = [\text{absorbance} \times \text{dilution fold}] / 14.6 \times 10$$

#### Assessment of the IgG-converted clones for human IL-6 receptor-neutralizing activity

The IL-6 receptor neutralizing activity was assessed using BaF3/gp130 which proliferates in an IL-6/IL-6 receptor-dependent manner. After three washes with RPMI1640 supplemented with 10% FBS, BaF3/gp130 cells were suspended at  $5 \times 10^4$  cells/ml in RPMI1640 supplemented with 60 ng/ml human interleukin-6 (TORAY), 60 ng/ml recombinant soluble human IL-6 receptor (SR344), and 10% FBS. The cell suspensions were dispensed (50 µl/well) into 96-well plates (CORNING). Then, the purified antibodies were diluted with RPMI1640 containing 10% FBS, and added to each well (50 µl/well). The cells were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for three days. WST-8 Reagent (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories) was diluted two-fold with PBS. Immediately after 20 µl of the reagent was added



to each well, the absorbance at 450 nm (reference wavelength: 620 nm) was measured using SUNRISE CLASSIC (TECAN). After culturing for two hours, the absorbance at 450 nm (reference wavelength: 620 nm) was measured again. The IL-6 receptor neutralizing activity was assessed using the change of absorbance during two hours as an indicator.

As a result, a number of antibodies whose activities were higher than that of the humanized PM-1 antibody (wild type (WT)) were obtained. Mutations in the antibodies whose activities were higher than that of WT are shown in Fig. 4. For example, as shown in Fig. 1, the neutralizing activity of RD\_6 was about 50 times higher than WT in terms of 100% inhibitory concentration.

#### Biacore-based affinity analysis of the IgG-converted clones

The clones whose activities were higher than that of the wild type were analyzed for antigen-antibody reaction kinetics using Biacore T100 (BIACORE). The antigen-antibody interaction was measured by immobilizing 1800 to 2600 RU (resonance units) of rec-Protein A (ZYMED) (hereinafter Protein A) onto a sensor chip, binding various antibodies onto the chip, and then running the antigen over the chip as an analyte. Various concentrations of recombinant human IL-6R sR (R&D systems) (hereinafter rhIL-6sR) were used as the antigen. All measurements were carried out at 25°C. The kinetic parameters, association rate constant  $k_a$  (1/Ms) and dissociation rate constant  $k_d$  (1/s) were calculated from the sensorgrams obtained by measurement. Then,  $K_D$  (M) was determined based on the rate constants. The respective parameters were determined using Biacore T100 Evaluation Software (BIACORE).

As a result, a number of antibodies exhibiting higher affinity than the humanized PM-1 antibody (wild type (WT)) were obtained. As an example, sensorgrams of the wild type (WT) and RD\_6 are shown in Figs. 2 and 3, respectively. The result of kinetic parameter analysis revealed that RD\_6 had about 50 times higher affinity than WT (Table 1). In addition to RD\_6, antibodies exhibiting affinity dozens of times higher than WT were also obtained. Mutations that result in higher affinity than WT are shown in Fig. 4.

Table 1

SAMPLE	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	2. 8E+6	1. 8E-3	6. 5E-10
RD_6	2. 3E+6	2. 8E-5	1. 2E-11

[Example 2] Improvement of antigen binding activity through various combinations of CDR alterations

Mutations associated with strong activity or high affinity were combined to create antibodies with stronger activity and higher affinity.

5

#### Production, expression, and purification of altered antibodies

Amino acids at selected sites were altered to produce altered antibodies. Specifically, mutations were introduced into the prepared H(WT) variable region (H(WT), SEQ ID NO: 107) and L(WT) variable region (L(WT), SEQ ID NO: 108) using the QuikChange Site-Directed  
10 Mutagenesis Kit (Stratagene) by the method described in the attached instruction manual. After it was confirmed that the antibody H chain gene fragment inserted into a plasmid was the humanized antibody variable region gene sequence of interest, the plasmid was digested with *XhoI* and *NotI*. A plasmid containing the antibody L chain gene fragment as an insert was digested with *EcoRI*. Then, the reaction mixtures were subjected to electrophoresis in 1%  
15 agarose gel. A DNA fragment of the expected size (about 400 bp) was purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) by the method described in the attached instruction manual. The DNA was eluted with 30 µl of sterile water. Then, the antibody H chain gene fragment was inserted into an animal cell expression vector to construct the H chain expression vector of interest. An expression vector for the L chain was also constructed in the same way.  
20 Ligation was carried out using the Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics). The *E. coli* strain DH5α (Toyobo) was transformed with the plasmids. The nucleotide sequence of each DNA fragment was determined with a DNA sequencer (ABI PRISM 3730xL DNA Sequencer or ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the method described in the attached  
25 instruction manual. The antibodies were expressed using the constructed expression vectors and purified by the method described in Example 1.

#### Assessment for the activity of neutralizing human IL-6 receptor

The purified antibodies were assessed for their neutralizing activity by the method  
30 described in Example 1. The neutralizing activity was assessed using 600 ng/ml human interleukin-6 (TORAY). A number of novel antibodies with stronger activity than WT were obtained. The CDR sequences of the antibodies are shown in Fig. 5. Of them, the antibody with the strongest activity (referred to as RDC\_23) has RDC\_5H as an H chain and RDC\_11L as an L chain. The neutralizing activity of RDC\_23 is shown in Fig. 6. The activity of RDC\_23  
35 was demonstrated to be about 100 times higher than WT in terms of 100% inhibitory concentration. Improved neutralizing activity was observed not only in RDC\_23, which is an

antibody having RDC\_5H as an H chain and RDC\_11L as an L chain, but also in antibodies RDC\_2, RDC\_3, RDC\_4, RDC\_5, RDC\_6, RDC\_7, RDC\_8, RDC\_27, RDC\_28, RDC\_29, RDC\_30, and RDC\_32, which all have L(WT) as an L chain, and RDC\_2H, RDC\_3H, RDC\_4H, RDC\_5H, RDC\_6H, RDC\_7H, RDC\_8H, RDC\_27H, RDC\_28H, RDC\_29H, RDC\_30H, and RDC\_32H as an H chain, respectively, as well as in an antibody referred to as RDC\_11, which has H(WT) and RDC\_11L as H and L chains, respectively. It was thus shown that antibodies having stronger neutralizing activity could be obtained by combining mutations discovered by affinity maturation. Furthermore, since antibodies containing such a combination of mutations had improved neutralizing activity, they were also expected to have improved affinity.

#### Biacore-based affinity analysis using Protein A

Thus, of the antibodies with improved neutralizing activity, RDC\_2, RDC\_3, RDC\_4, RDC\_5, RDC\_6, RDC\_7, RDC\_8, RDC\_11, and RDC\_23 were analyzed for antigen-antibody reaction kinetics using Biacore T100 (BIACORE). The antigen-antibody interaction was measured by immobilizing 4400 to 5000 RU of rec-Protein A (ZYMED) immobilized onto a sensor chip by the amine coupling method, binding various antibodies onto the chip, and then running the antigen over the chip as an analyte. For the antigen, various concentrations of rhIL-6sR were used. All measurements were carried out at 25°C. The kinetic parameters, association rate constant  $k_a$  (1/Ms) and dissociation rate constant  $k_d$  (1/s) were calculated from the sensorgrams obtained by measurement. Then,  $K_D$  (M) was determined based on the rate constants. The respective parameters were determined using Biacore T100 Evaluation Software (BIACORE). The result showed that RDC\_2, RDC\_3, RDC\_4, RDC\_5, RDC\_6, RDC\_7, RDC\_8, RDC\_11, and RDC\_23, all of which contained a combination of mutations, had a smaller  $K_D$  value than RD\_28 which contains a single mutation (Table 2). The sensorgram for RDC\_23 which has a higher affinity than others is shown in Fig. 7.

Table 2

SAMPLE	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
RD_28	9.4E+05	1.1E-04	1.2E-10
RDC_2	1.1E+06	2.5E-05	2.2E-11
RDC_3	1.0E+06	3.7E-05	3.7E-11
RDC_4	1.1E+06	2.9E-05	2.7E-11
RDC_5	1.2E+06	2.8E-05	2.2E-11
RDC_6	1.2E+06	3.5E-05	2.9E-11
RDC_7	1.1E+06	4.2E-05	3.8E-11
RDC_8	1.4E+06	3.6E-05	2.5E-11
RDC_11	1.1E+06	7.0E-05	6.5E-11
RDC_23	1.2E+06	3.1E-05	2.5E-11

This finding suggests that these antibodies have higher affinities than the parental antibodies that do not have the combinations of mutations. As in the case of the neutralizing activity, this indicates that antibodies having greater affinity can be obtained by combining mutations discovered by affinity maturation. The amino acid sequences of variants having higher activity or affinity than WT are shown below (mutations relative to WT are underlined). (HCDR2)

SEQ ID NO: 45 YISYSGITNYNPSLKS

(HCDR3)

SEQ ID NO: 57 LLARATAMDY

SEQ ID NO: 58 VLARATAMDY

SEQ ID NO: 59 ILARATAMDY

SEQ ID NO: 60 TLARATAMDY

SEQ ID NO: 61 VLARITAMDY

SEQ ID NO: 62 ILARITAMDY

SEQ ID NO: 63 TLARITAMDY

SEQ ID NO: 64 LLARITAMDY

(LCDR3)

SEQ ID NO: 79 GQGNRLPYT

Specifically, an anti-IL-6 receptor antibody with markedly improved affinity and neutralizing activity as compared to WT can be produced by designing the antibody to have Asn at amino acid position 9 in HCDR2, Leu, Val, Ile, or Thr at amino acid position 1 in HCDR3, Ala or Ile at amino acid position 5 in HCDR3, Gly at amino acid position 1 in LCDR3, and Arg at amino acid position 5 in LCDR3.

Biacore-based affinity analysis using Protein A/G



WT and RDC\_23 were analyzed for antigen-antibody reaction kinetics using Biacore T100 (BIACORE). The antigen-antibody interaction was measured by immobilizing purified Recomb Protein A/G (Pierce) (hereinafter Protein A/G) onto a sensor chip, binding various antibodies onto the chip, and then running the antigen as an analyte over the chip. Various concentrations of rhIL-6sR (R&D systems) and recombinant soluble IL-6 receptor (SR344 prepared in Example 1 were used as the antigen. The sugar chain structure of rhIL-6sR produced by baculovirus-infected insect cells is of high-mannose type. On the other hand, the sugar chain structure of SR344 produced by CHO cells is assumed to be of the complex sugar chain type with sialic acid at its end. Since the sugar chain structure of soluble IL-6 receptor in an actual human body is assumed to be of the complex sugar chain type with sialic acid at its end, SR344 is expected to have a structure closer to that of soluble IL-6 receptor in the human body. Thus, a comparison test between rhIL-6sR and SR344 was carried out in this experiment.

The kinetic parameters, association rate constant  $k_a$  (1/Ms) and dissociation rate constant  $k_d$  (1/s) were calculated from the sensorgrams obtained by measurement. Then,  $K_D$  (M) was determined based on the rate constants. The respective parameters were determined using Biacore T100 Evaluation Software (BIACORE).

A sensor chip was prepared by immobilizing about 3000 RU of Protein A/G onto CM5 (BIACORE) with the amine coupling method. The kinetics of the interaction between the two types of soluble IL-6 receptors (rhIL-6sR and SR344) and the antibodies (WT and RDC\_23) bound to Protein A/G was analyzed using the prepared sensor chip. The running buffer used was HBS-EP+, and the flow rate was 20  $\mu$ l/min. Each antibody was prepared so that about 100 RU of the antibody was bound to Protein A/G. For the analyte, rhIL-6sR was prepared at 0, 0.156, 0.313, and 0.625  $\mu$ g/ml using HBS-EP+, while SR344 was adjusted to 0, 0.0654, 0.131, and 0.261  $\mu$ g/ml. In the first step of the measurement, the antibodies of interest, WT and RDC\_23, were bound to Protein A/G, and an analyte solution was added thereto. After three minutes of interaction, the solution was switched with HBS-EP+ (BIACORE), and the dissociation phase was monitored for ten minutes. After measurement of the dissociation phase, the sensor chip was regenerated by washing with 10  $\mu$ l of 10 mM glycine-HCl (pH 1.5). The association, dissociation, and regeneration constitute one analytic cycle. All experiments were carried out at 37°C.

WT and RDC\_23 were measured according to the above cycle. The resulting sensorgrams for the two types of soluble IL-6 receptors, rhIL-6sR and SR344, are shown in Figs. 8, 9, 10, and 11. The obtained sensorgrams were kinetically analyzed using Biacore T100 Evaluation Software, which is a data analysis software specific for Biacore (Table 3). The result showed that when comparing rhIL-6sR and SR344, the affinities of both WT and RDC\_23 for SR344 were two- to three-fold weaker. For both rhIL-6sR and SR344, RDC\_23 had

affinities that are about 40 to 60 times improved as compared to WT. Thus, it was demonstrated that because of the combination of respective CDR alterations obtained by affinity maturation, RDC\_23 also had a markedly higher affinity than WT for SR344 whose structure is presumably close to that of soluble IL-6 receptor in the human body. All measurements described hereinafter in the Examples were carried out at 37°C to kinetically analyze the antigen-antibody reaction using SR344 and protein A/G.

Table 3

SAMPLE	ANALYTE	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	rhIL-6sR	1.3E+6	1.5E-3	1.2E-9
	SR344	4.9E+5	2.0E-3	4.0E-9
RDC_23	rhIL-6sR	1.6E+6	4.5E-5	2.8E-11
	SR344	6.4E+5	4.3E-5	6.7E-11

[Example 3] Generation of H53/L28 with improved pharmacokinetics and reduced immunogenicity risk through alterations of CDR and framework

The antibody obtained by humanizing a mouse PM-1 antibody (hereinafter referred to as wild type or WT; the WT H and L chains are referred to as H(WT) and L(WT), respectively) as described in Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6, was altered to improve the pharmacokinetics, reduce the immunogenicity risk, and increase the stability. The alterations are described below. For the purpose of improving the pharmacokinetics, the H and L chain variable region sequences of WT were altered to lower the isoelectric point.

#### Creation of a three-dimensional structure model for the humanized PM-1 antibody

First, to identify amino acid residues exposed on the surface of the variable regions of the humanized PM-1 antibody (H(WT)/L(WT)), a model for the Fv domain of the antibody obtained by humanizing a mouse PM-1 antibody was created by homology modeling using the MOE software (Chemical Computing Group Inc.).

#### Selection of alteration sites to reduce the isoelectric point of the humanized PM-1 antibody

A detailed analysis of the model created suggested that of the surface exposed amino acids in the FR sequence, H16, H43, H81, H105, L18, L45, L79, and L107 (in Kabat's numbering system; Kabat EA *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH), and of those in the CDR sequence, H31, H64, H65, L24, L27, L53, and L55, were potential candidates for the sites of alteration to reduce the isoelectric point without decreasing

the activity or stability.

#### Removal of remaining mouse sequences from the humanized PM-1 antibody

The humanized PM-1 antibody is an antibody whose sequence was obtained by humanizing the mouse PM-1 antibody (Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6). The H chain of the humanized PM-1 antibody was obtained by grafting CDR onto the NEW framework which is a human antibody variable region. However, mouse sequences remain at H27, H28, H29, H30, and H71 in the H chain to maintain the activity. From the perspective of immunogenicity risk, the best result is expected when the number of mouse sequences is minimized. Thus, the present inventors searched for sequences for converting H27, H28, H29, and H30 into human sequences.

#### Selection of alteration sites to improve the stability of the humanized PM-1 antibody

The present inventors speculated that it might be possible to improve the stability of the humanized PM-1 antibody (H(WT)/L(WT)) by substituting glycine for serine at H65 (stabilization of the turn structure; stabilization through conversion into an HCDR2 consensus sequence), isoleucine for methionine at H69 (stabilization of the hydrophobic core structure), serine for leucine at H70 (stabilization through replacement of the surface exposed residue with a hydrophilic residue), asparagine for threonine at H58 (stabilization through conversion into an HCDR2 consensus sequence), serine for threonine at L93 (stabilization through replacement of the surface exposed residue with a hydrophilic residue), and isoleucine for serine at H107 (stabilization of the  $\beta$  sheet) in its variable regions, and considered these alterations as candidates for increasing stability.

#### Removal of *in silico* predicted T-cell epitopes from the humanized PM-1 antibody

First, the variable regions of the humanized PM-1 antibody (H(WT)/L(WT)) were analyzed using TEPITOPE (Methods 2004 Dec;34(4):468-75). The result showed that the L chain CDR2 contained many T-cell epitopes that bind to HLA. Thus, TEPITOPE analysis was carried out to find alterations that would reduce the immunogenicity risk of the L chain CDR2 without decreasing the stability, binding activity, or neutralizing activity. The result demonstrated that HLA-binding T-cell epitopes can be removed without decreasing the stability, binding activity, or neutralizing activity by substituting glycine for threonine at L51 in the L chain CDR2.

#### Selection of respective framework sequences

Homology search can be performed for the individual frames by using a database

constructed with the data of human antibody amino acid sequences available from the public  
databases: Kabat Database (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/) and IMGT Database  
(http://imgt.cines.fr/). From the perspectives of reducing the isoelectric point, removing  
remaining mouse sequences, and improving the stability, human frameworks were selected by  
5 searching the database for human framework sequences containing the alterations described  
above. The result showed that the altered antibody H53/L28 met the requirements described  
above without decreasing the binding activity or neutralizing activity when its respective  
frameworks were constituted of the sequences indicated below. SOURCE indicates origins of  
the human sequences. Underlined amino acid residues in each sequence represent altered  
10 amino acids relative to WT.

Table 4

H53	SOURCE	SEQUENCE
FR1	Germline : IMGT_hVH_4_b	QVQLQESGPGGLVK <u>P</u> SE <u>T</u> LSLTC <u>A</u> VSGY <u>S</u> I <u>S</u>
FR2	Blood 1996 88: 4620-4629	WVRQPPGEGLEWIG
FR3	Germline : IMGT_hVH_4_b (EXCEPT BOLD-INDICATED H71 & H89)	RVTI <u>S</u> RDTSKNQFSL <u>K</u> LSSVTAADTA <u>A</u> YYCAR
FR4	J IMMUNOL 142: 4027-4033 (1989)	WGEGTLVTVSS

L28	SOURCE	SEQUENCE
FR1	Immunology. 1988 Aug;64(4):573-9	DIQMTQSPSSLSASVGDS <u>V</u> TITC
FR2	Germline : IMGT_hVk_1D_8	WYQQKPGKAP <u>E</u> LLIY
FR3	Germline : IMGT_hVk_8D_41	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLE <u>A</u> EDA <u>A</u> ATYYC
FR4	J. Exp. Med. 1987 185: 1435-1446	FGQGTKVE <u>I</u> E

Furthermore, the above-described FR3 of H53 contains a non-human sequence; thus, it  
15 is preferable to further reduce the immunogenicity risk. A possible alteration for reducing the  
immunogenicity risk is a sequence substitution resulting in an exchange of Ala at H89 to Val  
(SEQ ID NO: 127). Moreover, since Arg at H71 in FR3 of H53 is important for the binding  
activity (Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6), anti-human IL-6 receptor antibodies containing  
H and L chains whose frameworks consist of a fully human sequence may be produced by using  
20 an FR3 sequence of the human VH1 subclass (SEQ ID NO: 128) or the human VH3 subclass  
(SEQ ID NO: 129) where Arg at H71 is conserved.

Selection of respective CDR sequences

The respective CDR sequences of H53/L28 were selected as shown below, from the  
25 perspectives of reducing the isoelectric point, improving the stability, and removing T-cell



epitopes, and most importantly, not decreasing the binding activity or neutralizing activity.

Table 5

H53	SEQUENCE
CDR1	<u>D</u> DHAW <u>S</u>
CDR2	YISYSGIT <u>N</u> YNPSLK <u>G</u>
CDR3	SLARTTAMDY
L28	SEQUENCE
CDR1	<u>Q</u> ASQDISSYLN
CDR2	YG <u>S</u> ELHS
CDR3	QQGNS <u>L</u> PYT

Construction of expression vector for altered antibody, expression and purification of the antibody

An expression vector for altered antibody was constructed, and the antibody was expressed and purified by the method described in Example 1. The humanized mouse PM-1 antibody was successively altered to have the framework and CDR sequences selected for mutagenesis vectors for H(WT) and L(WT) of the antibody. Using the finally obtained H53/L28-encoding animal cell expression vector (antibody amino acid sequences: H53, SEQ ID NO: 104; and L28, SEQ ID NO: 105) having the selected framework and CDR sequences, H53/L28 was expressed and purified, and then used in the assessment described below.

Assessment of altered antibody H53/L28 for the isoelectric point by isoelectric focusing

WT and the altered antibody H53/L28 were analyzed by isoelectric focusing to assess the change in the isoelectric point of the whole antibody caused by the amino acid alterations in the variable regions. The procedure of isoelectric focusing is described below. Using Phastsystem Cassette (Amersham Biosciences), Phast-Gel Dry IEF gel (Amersham Biosciences) was rehydrated for about 30 minutes in the rehydration solution indicated below.

Milli-Q water	1.5 ml
Pharmalyte 5-8 for IEF (Amersham Biosciences)	50 μl
Pharmalyte 8-10.5 for IEF (Amersham Biosciences)	50 μl

Electrophoresis was carried out in PhastSystem (Amersham Biosciences) using the rehydrated gel according to the program indicated below. The samples were loaded onto the gel in Step 2. Calibration Kit for pI (Amersham Biosciences) was used as the pI markers.

Step 1:	2000 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	75 Vh
Step 2:	200 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	15 Vh
Step 3:	2000 V	2.5 mA	3.5 W	15°C	410 Vh

After electrophoresis, the gel was fixed with 20% TCA, and then silver-stained using the Silver Staining Kit, protein (Amersham Biosciences), according to the protocol attached to the kit. After staining, the isoelectric point of the sample (the whole antibody) was calculated from the known isoelectric points of pI markers. The result showed that the isoelectric point of WT was about 9.3, and the isoelectric point of the altered antibody H53/L28 was about 6.5 to 6.7. The amino acid substitution in WT yielded H53/L28 whose isoelectric point is about 2.7 lowered. The theoretical isoelectric point of the variable regions of H53/L28 (VH and VL sequences) was calculated by GENETYX (GENETYX CORPORATION). The determined theoretical isoelectric point was 4.52. Meanwhile, the theoretical isoelectric point of WT was 9.20. Thus, the amino acid substitution in WT yielded H53/L28 having a variable region whose theoretical isoelectric point is about 4.7 lowered.

#### Assessment of H53/L28 for the human IL-6 receptor-neutralizing activity

WT and H53/L28 were assessed by the method described in Example 1. The result is shown in Fig. 12. The activity of altered antibody H53/L28 to neutralize BaF/gp130 improved several fold in comparison to WT. Specifically, the comparison of H53/L28 with WT revealed that the isoelectric point could be reduced while improving the neutralizing activity.

#### Biacore-based analysis of H53/L28 for the affinity for human IL-6 receptor

The affinities of WT and H53/L28 for human IL-6 receptor were assessed by kinetic analysis using Biacore T100 (BIACORE). The antigen-antibody interaction was measured by immobilizing purified Recomb Protein A/G (Pierce) (hereinafter Protein A/G) onto a sensor chip, binding various antibodies onto the chip, and then running the antigen over the chip as an analyte. Various concentrations of recombinant soluble IL-6 receptor (SR344) were used as the antigen. The measurement conditions were the same as described in Example 2.

The sensorgrams obtained for WT and H53/L28 are shown in Fig. 13. Kinetic analysis was carried out using Biacore-specific data analysis software Biacore T100 Evaluation Software. The result is shown in Table 6. The result showed that  $K_D$  in H53/L28 was reduced about six-fold compared to WT, and this means the affinity was improved about six-fold. Specifically, the comparison of H53/L28 with WT revealed that the affinity could be improved six-fold while reducing the isoelectric point at the same time. A detailed analysis suggested that the amino acid mutation that contributed to the affinity improvement was the substitution of glycine for threonine at L51. In other words, it is thought that the affinity can be improved by

substituting glycine for threonine at L51.

Table 6

SAMPLE	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	4.9E+5	2.0E-3	4.0E-9
H53/L28	7.6E+5	5.2E-4	6.8E-10

5

#### Prediction of T-cell epitopes in H53/L28 using TEPITOPE

H53/L28 was analyzed by TEPITOPE (Methods. 2004 Dec;34(4):468-75). The result showed that the number of potential HLA-binding peptides was significantly reduced in H53/L28 as compared to WT. This suggests reduction of the immunogenicity risk in human.

10

#### [Example 4] Assessment of the plasma retention of H53/L28

##### Assessment of the altered antibody H53/L28 for its plasma pharmacokinetics in normal mice

To assess the retention in plasma of the altered antibody H53/L28 with reduced isoelectric point, the plasma pharmacokinetics was compared between WT and the altered antibody H53/L28 using normal mice.

A single dose of WT or H53/L28 was intravenously or subcutaneously administered at 1 mg/kg to mice (C57BL/6J; Charles River Japan, Inc.). The blood was collected before administration and 15 minutes, two hours, eight hours, one day, two days, five days, seven days, 14 days, 21 days, and 28 days after administration. Note that the blood was collected at 15 minutes after administration only from the intravenous administration groups. The collected blood was immediately centrifuged at 4°C and 15,000 rpm for 15 minutes to obtain plasma. The separated blood plasma was stored until use in a freezer at -20°C or below.

The concentration in the mouse plasma was determined by ELISA. First, Recombinant Human IL-6 sR (R&D Systems) was biotinylated using EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (PIERCE). The biotinylated human-sIL-6R was dispensed into Reacti-Bind Streptavidin High Binding Capacity (HBC) Coated Plates (PIERCE), and then incubated at room temperature for one hour or more. Thus, human-sIL-6R-immobilized plates were prepared as described above. Mouse plasma samples and standard samples (plasma concentrations: 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, and 0.05 µg/ml) were prepared and dispensed into the human-sIL-6R-immobilized plates. The samples were incubated at room temperature for one hour, and then anti-human IgG-AP (SIGMA) was added for reaction. After color development using the BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry

Laboratories) as a substrate, the absorbance at 650 nm was measured with a microplate reader. The plasma concentrations in the mice were determined based on the absorbance of the calibration curve using the analytical software SOFTmax PRO (Molecular Devices). The time courses for the plasma concentrations of WT and H53/L28 after intravenous administration and subcutaneous administration are shown in Figs. 14 and 15, respectively.

The obtained plasma concentration-time data were evaluated by a model-independent analysis using the pharmacokinetic analysis software WinNonlin (Pharsight) to estimate pharmacokinetic parameters (AUC, clearance (CL), and half-life (T1/2)). T1/2 was estimated from the plasma concentrations at the last three points or those in the terminal phase automatically selected by WinNonlin. BA was calculated from the ratio of AUC after subcutaneous administration versus AUC after intravenous administration. The determined pharmacokinetic parameters are shown in Table 7.

Table 7

	iv		SC		
	CL mL/h/kg	T1/2 day	CL/F mL/h/kg	T1/2 day	BA %
WT	0.177	18.5	0.180	14.7	113
H53/L28	0.102	23.5	0.086	29.7	121

The half-life (T1/2) of H53/L28 in plasma after intravenous administration was prolonged to about 1.3 times that of WT, while the clearance was reduced about 1.7 times. T1/2 of H53/L28 after subcutaneous administration was prolonged to about twice that of WT, while the clearance was reduced about 2.1 times. Thus, the pharmacokinetics of H53/L28 could be significantly improved by lowering the isoelectric point of WT.

H53/L28 is a humanized anti-IL-6 receptor antibody with improved binding activity and neutralizing activity, reduced immunogenicity risk, and significantly improved pharmacokinetics as compared to the humanized PM-1 antibody (WT). Therefore, the alterations used to create H53/L28 may be very useful in the development of pharmaceuticals.

[Example 5] Preparation of the PF1 antibody

#### Construction of expression and mutagenesis vectors for the humanized PM-1 antibody

A total of four CDR mutations discovered in Example 2 which improve the affinity of RDC\_23 (two each in the H and L chains) were introduced into H53/L28 created in Example 4. The H and L chains obtained by introducing the mutations of RDC\_23 into H53/L28 were named PF1\_H and PF1\_L, respectively. The altered antibody was prepared, expressed, and



purified by the method described in Example 1. The amino acid sequences of PF1\_H and PF1\_L are shown in SEQ ID NOs: 22 and 23, respectively.

#### Assessment for the human IL-6 receptor-neutralizing activity

5 The neutralizing activity of the purified PF1 antibody was assessed by the method described in Example 1. The neutralizing activity assessment was carried out using 600 ng/ml human interleukin-6 (TORAY). The neutralizing activities of WT and PF1 are shown in Fig. 16. PF1 was demonstrated to have an activity about 100 to 1000 times higher than WT in terms of 100% inhibitory concentration.

#### Biacore-based analysis of the PF1 antibody for the affinity for human IL-6 receptor

10 This measurement was carried out under the same conditions described in Example 2. The running buffer used was HBS-EP+, and the flow rate was 20  $\mu$ l/min. Each antibody was prepared so that about 100 RU of the antibody was bound to Protein A/G. SR344 was prepared at 0, 0.065, 0.131, and 0.261  $\mu$ g/ml using HBS-EP+ and used as an analyte. In the first step of the measurement, the antibody in solution was bound to Protein A/G, and the analyte solution was allowed to interact therewith. After three minutes of interaction, the solution was switched to HBS-EP+, and the dissociation phase was monitored for 10 or 15 minutes. After measurement of the dissociation phase, the sensor chip was regenerated by washing with 10  $\mu$ l of 10 mM glycine-HCl (pH 1.5). The association, dissociation, and regeneration constitute one analysis cycle. Each antibody was measured according to this cycle.

25 The obtained sensorgram for PF1 is shown in Fig. 17. The sensorgram was kinetically analyzed using the Biacore-specific data analysis software, Biacore T100 Evaluation Software. The result is shown along with those for WT and H53/L28 in Table 8. The result showed that the affinity of PF1 was about 150 times improved as compared to WT. RDC\_23 has a high affinity as a result of combination through affinity maturation, and H53/L28 has an enhanced pharmacokinetics and improved affinity. Through combination of both, PF1 obtained a higher affinity than RDC\_23 or H53/L28 by an additive effect.

Table 8

SAMPLE	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	4.9E+05	2.0E-03	4.0E-09
RDC_23	6.4E+05	4.3E-05	6.7E-11
H53/L28	7.6E+05	5.2E-04	6.8E-10
PF1	1.3E+06	3.5E-05	2.7E-11

#### Assessment of the PF1 antibody for thermal stability by differential scanning calorimetry (DSC)

5 To assess the thermal stability of the PF1 antibody, the midpoint of thermal denaturation (T<sub>m</sub> value) was determined by differential scanning calorimetry (DSC). The purified antibodies of WT and PF1 were dialyzed against a solution of 20 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, pH 6.0 (EasySEP, TOMY). DSC measurement was carried out at a heating rate of 1°C/min from 40 to 100°C at a protein concentration of about 0.1 mg/ml. The result showed  
10 that the T<sub>m</sub> of the WT Fab domain was about 94°C and that of the PF1 Fab domain was 91°C. The T<sub>m</sub> of the Fab domain of an IgG1 type antibody molecule is generally within the range of about 60 to 85°C (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007 Apr 13;355(3):751-7; Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):3049-60). Thus, the observed thermal stability of the PF1 antibody was extremely high as compared to those of typical IgG1 molecules.

15

#### Assessment of the PF1 antibody for stability at high concentrations

The PF1 antibody was assessed for stability in high concentration formulations. Purified WT and PF1 antibodies were dialyzed against a solution of 20 mM histidine chloride, 150 mM NaCl, pH 6.5 (EasySEP, TOMY), and then concentrated by ultrafilters. The  
20 antibodies were tested for stability at high concentrations. The conditions were as follows.

Antibodies: WT and PF1

Buffer: 20 mM histidine chloride, 150 mM NaCl, pH 6.0

Concentration: 145 mg/ml

Storage temperature and time period: 25°C for two weeks, 25°C for four weeks, or 25°C  
25 for seven weeks

Aggregation assessment method:

System: Waters Alliance

Column: G3000SWx1 (TOSOH)

Mobile phase: 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0

30 Flow rate, wavelength: 0.5 ml/min, 220 nm

100 times diluted samples were analyzed

The contents of aggregate in the initial formulations (immediately after preparation) and formulations stored under various conditions were evaluated by the gel filtration chromatography described above. Differences (amounts increased) in the content of aggregate relative to the initial formulations are shown in Fig. 18. As a result, the following findings were obtained: (1) both WT and PF1 were very stable; (2) the amount of aggregate increased during seven weeks at 25°C was about 0.7% for WT and about 0.3% for PF1, which means that the amount of aggregate increased per month at 25°C was about 0.4% and about 0.17%, respectively; and (3) PF1 was markedly stable at high concentrations. WO 2003/039485 has disclosed data on the stability of Daclizumab, which is available as a high concentration IgG formulation on the market, at 25°C in a 100 mg/ml preparation. The amount of aggregate increased per month at 25°C is about 0.3% in the formulation of 100 mg/ml Daclizumab. Even when compared to Daclizumab, PF1 exhibits an excellent stability at high concentrations. The increase of the number of aggregates is very problematic in developing high-concentration liquid formulations as pharmaceuticals. The increase of PF1 antibody aggregate was demonstrated to be very small even when the concentration of the PF1 antibody was high.

PF1 is a molecule resulting from alteration of WT. The purposes of the alteration include improvement of the antigen-binding activity, improvement of the pharmacokinetics by lowering its isoelectric point, reduction of the immunogenicity risk by removing T-cell epitopes and remaining mouse sequences, and improvement of the stability. Indeed, the stability of PF1 in 100 mg/ml or higher concentration preparations was demonstrated to be very high even when compared to WT. Stable and highly convenient high-concentration formulations for subcutaneous administration can be provided by using such molecules.

[Example 6] PK/PD test of the PF1 antibody using human IL-6 receptor transgenic mice

Test for pharmacokinetics (*in vivo* kinetics) using human IL-6 receptor transgenic mice

WT and PF1 prepared in Example 5 were assessed for their pharmacokinetics (*in vivo* kinetics) in human IL-6 receptor transgenic mice (hIL-6R tg mice; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1995 May 23;92(11):4862-6) and their human soluble IL-6 receptor-neutralizing activity *in vivo*. WT and PF1 were intravenously administered once at 10 mg/kg into hIL-6R tg mice. Blood was collected before administration and 15 minutes, two, four, and eight hours, one day, two, four, and seven days after administration. The blood collected was immediately centrifuged at 4°C and 15,000 rpm for 15 minutes to obtain blood plasma. The separated plasma was stored in a freezer at -20°C or below until use.

The concentrations in the mouse plasma were determined by ELISA. Standard samples were prepared at 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, and 0.1 µg/ml as concentrations in plasma.

Mouse plasma samples and standard samples were dispensed into immunoplates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge nunc International)) coated with Anti-human IgG ( $\gamma$ -chain specific) F(ab')<sub>2</sub> (Sigma). The samples were incubated at room temperature for one hour, and then Goat Anti-Human IgG-BIOT (Southern Biotechnology Associates) and Streptavidin-alkaline  
5 phosphatase conjugate (Roche Diagnostics) were subsequently added for reaction. After color development using the BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) as a substrate, the absorbance at 650 nm was measured with a microplate reader. The concentrations in the mouse plasma were determined based on the absorbance of the calibration curve using the analytical software SOFTmax PRO (Molecular Devices). The time  
10 courses for the plasma concentrations of WT and PF1 are shown in Fig. 19. The plasma PF1 concentration four days after administration was about five times higher than WT. This suggests that the pharmacokinetics of PF1 of human IL-6 receptor transgenic mice is improved as compared to WT.

The human IL-6 receptor transgenic mice have been demonstrated to produce plasma  
15 circulating human soluble IL-6 receptor. Thus, the human soluble IL-6 receptor-neutralizing efficacy in plasma can be assessed by administering anti-human IL-6 receptor antibodies to human IL-6 receptor transgenic mice.

The concentration of free human soluble IL-6 receptor in mouse plasma was determined to assess the degree of neutralization of human soluble IL-6 receptor by administration of WT or  
20 PF1. Six microliters of the mouse plasma was diluted two-fold with a dilution buffer containing BSA. The diluted plasma was loaded onto an appropriate amount of rProtein A Sepharose Fast Flow resin (GE Healthcare) dried in 0.22- $\mu$ m filter cup (Millipore), and all IgG type antibodies (mouse IgG, anti-human IL-6 receptor antibody, and anti-human IL-6 receptor antibody-human soluble IL-6 receptor complex) in the plasma were adsorbed by Protein A.  
25 Then, the solution in the cup was spinned down using a high-speed centrifuge to collect the solution that passed through. Since the solution that passed through does not contain Protein A-bound anti-human IL-6 receptor antibody-human soluble IL-6 receptor complex, the concentration of free soluble IL-6 receptor can be determined by measuring the concentration of human soluble IL-6 receptor in the passed solution. The concentration of soluble IL-6 receptor  
30 was determined using Quantikine Human IL-6 sR (R&D Systems). The concentration of free soluble IL-6 receptor in mice was measured 4, 8, 24, 48, 96, and 168 hours after administration of WT or PF1 according to the attached instruction manual.

The result is shown in Fig. 20. In both cases of WT and PF1, the concentration of free soluble IL-6 receptor was 10 ng/ml or less, four hours and up to eight hours after intravenous  
35 administration of a single dose of WT or PF1 at 10 mg/kg, indicating that the human soluble IL-6 receptor was neutralized. However, while the concentration of free soluble IL-6 receptor



was about 500 ng/ml 24 hours after WT administration, it was 10 ng/ml or less after PF1 administration. This indicates that PF1 neutralizes human soluble IL-6 receptor in a more sustainable way than WT.

PF1 was created by combining RDC\_23 discovered through affinity maturation and H53/L28 exhibiting improved properties such as improved pharmacokinetics, and thus predicted to be able to exhibit prolonged retention in plasma and high neutralizing activity *in vivo*. Indeed, as compared to WT, PF1 was demonstrated to be more sustainable in plasma and to exhibit a prolonged neutralizing effect in human IL-6 receptor transgenic mice producing human soluble IL-6 receptor.

PF1 is more superior than WT (humanized PM-1 antibody) in terms of immunogenicity risk and stability in high concentration preparations, as well as retention in plasma and IL-6 receptor-neutralizing effect in human IL-6 receptor transgenic mice. Thus, the alterations made to create PF1 may be very useful in the development of pharmaceuticals.

[Example 7] Improvement of the stability of IgG2 and IgG4 under acidic condition

Construction of expression vectors for IgG2- or IgG4-converted humanized IL-6 receptor antibodies and expression of the antibodies

To reduce the Fcγ receptor binding, the constant region of humanized PM-1 antibody (Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6), which is of the IgG1 isotype, was substituted with IgG2 or IgG4 (Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8) to generate molecules WT-IgG2 (SEQ ID NO: 109) and WT-IgG4 (SEQ ID NO: 110). An animal cell expression vector was used to express the IgGs. An expression vector, in which the constant region of humanized PM-1 antibody (IgG1) used in Example 1 was digested with *NheI/NotI* and then substituted with the IgG2 or IgG4 constant region by ligation, was constructed. The nucleotide sequence of each DNA fragment was determined with a DNA sequencer (ABI PRISM 3730xL DNA Sequencer or ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the attached instruction manual. Using the WT L chain, WT-IgG1, WT-IgG2, and WT-IgG4 were expressed by the method described in Example 1.

- (1) Humanized PM-1 antibody (WT-IgG1) H chain, SEQ ID NO: 15 (amino acid sequence)
- (2) WT-IgG2 H chain, SEQ ID NO: 109 (amino acid sequence)
- (3) WT-IgG4 H chain, SEQ ID NO: 110 (amino acid sequence)

Purification of WT-IgG1, WT-IgG2, and WT-IgG4 through elution from Protein A using hydrochloric acid

50  $\mu$ l of rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) suspended in TBS was added to the obtained culture supernatants, and the combined solutions were mixed by inversion at 4°C for four hours or more. The solutions were transferred into 0.22- $\mu$ m filter cups of Ultrafree<sup>(R)</sup>-MC (Millipore). After washing three times with 500  $\mu$ l of TBS, the rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> resins were suspended in 100  $\mu$ l of 10 mM HCl/150 mM NaCl (pH 2.0) and the mixtures were incubated for two minutes to elute the antibodies (hydrochloric acid elution). Immediately, the eluates were neutralized by adding 6.7  $\mu$ l of 1.5 M Tris-HCl (pH 7.8). The elution was carried out twice, yielding 200  $\mu$ l of purified antibodies.

#### 10 Gel filtration chromatography analysis of WT-IgG1, WT-IgG2, and WT-IgG4 purified by hydrochloric acid elution

The contents of aggregate in the purified samples obtained by hydrochloric acid elution were assessed by gel filtration chromatography analysis.

Aggregation assessment method:

15                   System: Waters Alliance  
                       Column: G3000SWxl (TOSOH)  
                       Mobile phase: 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0  
                       Flow rate, wavelength: 0.5 ml/min, 220 nm

The result is shown in Fig. 21. While the content of aggregate in WT-IgG1 after purification was about 2%, those of WT-IgG2 and WT-IgG4 after purification were about 25%. This suggests that IgG1 is stable to acid during hydrochloric acid elution, and by contrast, IgG2 and IgG4 are unstable and underwent denaturation/aggregation. Thus, the stability of IgG2 and IgG4 under acidic condition was demonstrated to be lower than that of IgG1. Protein A has been frequently used to purify IgG molecules, and the IgG molecules are eluted from Protein A under acidic condition. In addition, virus inactivation, which is required when developing IgG molecules as pharmaceuticals, is generally carried out under acidic condition. It is thus desirable that the stability of IgG molecules under acidic condition is higher. However, the stability of IgG2 and IgG4 molecules under acidic condition was found to be lower than that of IgG1, and suggests for the first time that there is a problem of denaturation/aggregation under acidic condition in developing IgG2 and IgG4 molecules as pharmaceuticals. It is desirable that this problem of denaturation/aggregation be overcome when developing them as pharmaceuticals. To date, however, no report has been published on a method for solving this problem through amino acid substitution.

#### 35 Preparation and assessment of WT-IgG2 and WT-IgG4 having an altered CH3 domain

The stability of IgG2 and IgG4 molecules under acidic condition was demonstrated to

be lower than that of IgG1. Thus, altered forms of IgG2 and IgG4 molecules were tested to improve the stability under acidic condition. According to models for the constant regions of IgG2 and IgG4 molecules, one of the potential destabilizing factors under acidic condition was thought to be the instability at the CH3-CH3 domain interface. As a result of various examinations, methionine at position 397 in the EU numbering system in IgG2, or arginine at position 409 in the EU numbering system in IgG4 was thought to destabilize the CH3/CH3 interface. Then, altered IgG2 and IgG4 antibodies were prepared. An altered IgG2 antibody comprises the substitution of valine for methionine at position 397 in the EU numbering system (IgG2-M397V, SEQ ID NO: 111 (amino acid sequence)) and an altered IgG4 antibody comprises the substitution of lysine for arginine at position 409 in the EU numbering system (IgG4-R409K, SEQ ID NO: 112 (amino acid sequence)).

The methods used for constructing expression vectors for the antibodies of interest, and expressing and purifying the antibodies, were the same as those used for the hydrochloric acid elution described above. Gel filtration chromatography analysis was carried out to estimate the contents of aggregate in the purified samples obtained by hydrochloric acid elution from Protein A.

Aggregation assessment method:

System: Waters Alliance

Column: G3000SWxl (TOSOH)

Mobile phase: 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0

Flow rate, wavelength: 0.5 ml/min, 220 nm

The result is shown in Fig. 21. While the content of aggregate in WT-IgG1 after purification was about 2%, those in WT-IgG2 and WT-IgG4 after purification were about 25%. By contrast, the contents of aggregate in variants with altered CH3 domain, IgG2-M397V and IgG4-R409K, were comparable (approx. 2%) to that in IgG1. This finding demonstrates that the stability of an IgG2 or IgG4 antibody under acidic condition can be improved by substituting valine for methionine of IgG2 at position 397 in the EU numbering system or lysine for arginine of IgG4 at position 409 in the EU numbering system, respectively. Furthermore, the midpoint temperatures of thermal denaturation of WT-IgG2, WT-IgG4, IgG2-M397V, and IgG4-R409K were determined by the same method as described in Example 5. The result showed that the T<sub>m</sub> value for the altered CH3 domain was higher in IgG2-M397V and IgG4-R409K as compared to WT-IgG2 and WT-IgG4, respectively. This suggests that IgG2-M397V and IgG4-R409K are also superior in terms of thermal stability as compared to WT-IgG2 and WT-IgG4, respectively.

IgG2 and IgG4 are exposed to acidic condition in virus inactivation process and in the purification process using Protein A. Thus, denaturation/aggregation in the above processes

was problematic. However, it was discovered that the problem could be solved by using IgG2-M397V and IgG4-R409K for the sequences of IgG2 and IgG4 constant regions. Thus, these alterations were revealed to be very useful in developing IgG2 and IgG4 antibody pharmaceuticals. Furthermore, the usefulness of IgG2-M397V and IgG4-R409K was also demonstrated by the finding that they are superior in thermal stability.

[Example 8] Improvement of heterogeneity derived from disulfide bonds in IgG2

Purification of WT-IgG1, WT-IgG2, and WT-IgG4 through acetic acid elution from Protein A

50 µl of rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) suspended in TBS was added to the culture supernatants obtained in Example 7, and the combined solutions were mixed by inversion at 4°C for four hours or more. The solutions were transferred into 0.22-µm filter cups of Ultrafree<sup>(R)</sup>-MC (Millipore). After washing three times with 500 µl of TBS, the rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> resins were suspended in 100 µl of aqueous solution of 50 mM sodium acetate (pH 3.3) and the mixtures were incubated for two minutes to elute the antibodies. Immediately, the eluates were neutralized by adding 6.7 µl of 1.5 M Tris-HCl (pH 7.8). The elution was carried out twice, yielding 200 µl of purified antibodies.

Analysis of WT-IgG1, WT-IgG2, and WT-IgG4 by cation exchange chromatography (IEC)

Purified WT-IgG1, WT-IgG2, and WT-IgG4 were analyzed for homogeneity by cation exchange chromatography.

Assessment method using IEC:

System: Waters Alliance

Column: ProPac WCX-10 (Dionex)

Mobile phase A: 25 mM MES-NaOH, pH 6.1

B: 25 mM MES-NaOH, 250 mM Na-Acetate, pH 6.1

Flow rate, wavelength: 0.5 ml/min, 280 nm

GradientB: 50%-75% (75 min) in the analysis of WT-IgG1

B: 30%-55% (75 min) in the analysis of WT-IgG2 and WT-IgG4

The result is shown in Fig. 22. WT-IgG2 showed more than one peak in the ion exchange analysis while WT-IgG1 and WT-IgG4 exhibited a single peak. This suggests that the IgG2 molecule is more heterogeneous as compared to IgG1 and IgG4. Indeed, IgG2 isotypes have been reported to have heterogeneity derived from disulfide bonds in the hinge region (Non-patent Document 30). Thus, the hetero-peaks of IgG2 shown in Fig. 22 are also assumed to be objective substance/related substances derived from the disulfide bonds. It is not easy to manufacture them as a pharmaceutical in large-scale while maintaining the objective



substances/related substances related heterogeneity between productions. Thus, homogeneous (less heterogeneous) substances are desirable as much as possible for antibody molecules to be developed as pharmaceuticals. For wild type IgG2, there is a problem of homogeneity which is important in developing antibody pharmaceuticals. Indeed, US20060194280 (A1) has shown that natural IgG2 gives various hetero-peaks as a result of the disulfide bonds in ion exchange chromatography analysis, and that the biological activity varies among these peaks. US20060194280 (A1) reports refolding in the purification process as a method for combining the hetero-peaks into a single one, but use of such a process in the production is costly and complicated. Thus, a preferred method for combining the hetero-peaks into a single one is based on amino acid substitution. Although the heterogeneity originated from disulfide bonds in the hinge region should be overcome to develop IgG2 as pharmaceuticals, no report has been published to date on a method for solving this problem through amino acid substitution.

#### Preparation and assessment of altered WT-IgG2 CH1 domain and hinge region

As shown in Fig. 23, there are various potential disulfide bond patterns for an IgG2 molecule. Possible causes of the heterogeneity derived from the hinge region of IgG2 were differential pattern of disulfide bonding and free cysteines. IgG2 has two cysteines (at positions 219 and 220 in the EU numbering system) in the upper hinge region, and cysteines adjacent to the two upper-hinge cysteines include cysteine at position 131 in the EU numbering system in the H chain CH1 domain and L chain C-terminal cysteine, and two corresponding cysteines in the H chain upper hinge of the dimerization partner. Specifically, there are eight cysteines in total in the vicinity of the upper hinge region of IgG2 when the antibody is in the associated form of H2L2. This may be the reason for the various heterogeneous patterns due to wrong disulfide bonding and free cysteines.

The hinge region sequence and CH1 domain of IgG2 were altered to reduce the heterogeneity originated from the IgG2 hinge region. Examinations were conducted to avoid the heterogeneity of IgG2 due to differential pattern of disulfide bonding and free cysteines. The result of examining various altered antibodies suggested that the heterogeneity could be avoided without decreasing the thermal stability by substituting serine and lysine for cysteine and arginine at positions 131 and 133 in the EU numbering system, respectively, in the H chain CH1 domain, and substituting serine for cysteine at position 219, EU numbering, in the upper hinge of H chain of the wild type IgG2 constant region sequence (hereinafter IgG2-SKSC) (IgG2-SKSC, SEQ ID NO: 120). These substitutions would enable IgG2-SKSC to form a homogenous covalent bond between H and L chains, which is a disulfide bond between the C-terminal cysteine of the L chain and cysteine at position 220 in the EU numbering system (Fig. 24).

The methods described in Example 1 were used to construct an expression vector for IgG2-SKSC and to express and purify IgG2-SKSC. The purified IgG2-SKSC and wild type IgG2 (WT-IgG2) were analyzed for homogeneity by cation exchange chromatography.

Assessment method using IEC:

- 5                   System: Waters Alliance
- Column: ProPac WCX-10 (Dionex)
- Mobile phase     A: 25 mM MES-NaOH, pH 5.6
- B: 25 mM MES-NaOH, 250 mM Na-Acetate, pH 5.6
- Flow rate, wavelength: 0.5 ml/min, 280 nm
- 10               Gradient B: 50%-100% (75 min)

The result is shown in Fig. 25. As expected above, IgG2-SKSC was shown to be eluted at a single peak while WT-IgG2 gave multiple peaks. This suggests that the heterogeneity derived from disulfide bonds in the hinge region of IgG2 can be avoided by using alterations such as those used to generate IgG2-SKSC, which allow formation of a single

15   disulfide bond between the C-terminal cysteine of the L chain and cysteine at position 220 in the EU numbering system. The midpoint temperatures of thermal denaturation of WT-IgG1, WT-IgG2, and IgG2-SKSC were determined by the same methods as described in Example 5. The result showed that WT-IgG2 gave a peak for Fab domain which has a lower T<sub>m</sub> value than WT-IgG1, while IgG2-SKSC did not give such a peak. This suggests that IgG2-SKSC is also

20   superior in thermal stability as compared to WT-IgG2.

Although wild type IgG2 was thought to have a homogeneity problem which is important in developing antibody pharmaceuticals, it was found that this problem could be solved by using IgG2-SKSC for the constant region sequence of IgG2. Thus, IgG2-SKSC is very useful in developing IgG2 antibody pharmaceuticals. Furthermore, the usefulness of

25   IgG2-SKSC was also demonstrated by the finding that it is superior in thermal stability.

[Example 9] Improvement of C-terminal heterogeneity in IgG molecules

#### Construction of an expression vector for H chain C-terminal $\Delta$ GK antibody from WT-IgG1

30               For heterogeneity of the C-terminal sequences of an antibody, deletion of C-terminal amino acid lysine residue, and amidation of the C-terminal amino group due to deletion of both of the two C-terminal amino acids, glycine and lysine, have been reported (Non-patent Document 32). The absence of such heterogeneity is preferred when developing antibody pharmaceuticals. Actually, in humanized PM-1 antibody TOCILIZUMAB, the major

35   component is the sequence that lacks the C-terminal amino acid lysine, which is encoded by the nucleotide sequence but deleted in post-translational modification, and the minor component

having the lysine also coexists as heterogeneity. Thus, the C-terminal amino acid sequence was altered to reduce the C-terminal heterogeneity. Specifically, the present inventors altered the nucleotide sequence of wild type IgG1 to delete the C-terminal lysine and glycine from the H chain constant region of the IgG1, and assessed whether the amidation of the C-terminal amino group could be suppressed by deleting the two C-terminal amino acids glycine and lysine.

Mutations were introduced into the C-terminal sequence of the H chain using pB-CH vector encoding the humanized PM-1 antibody (WT) obtained in Example 1. The nucleotide sequence encoding Lys at position 447 and/or Gly at position 446 in the EU numbering system was converted into a stop codon by introducing a mutation using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the method described in the attached instruction manual. Thus, expression vectors for antibody engineered to lack the C-terminal amino acid lysine (position 447 in the EU numbering system) and antibody engineered to lack the two C-terminal amino acids glycine and lysine (positions 446 and 447 in the EU numbering system, respectively) were constructed. H chain C-terminal  $\Delta$ K and  $\Delta$ GK antibodies were obtained by expressing the engineered H chains and the L chain of the humanized PM-1 antibody. The antibodies were expressed and purified by the method described in Example 1.

Purified H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody was analyzed by cation exchange chromatography according to the following procedure. The effect of the C-terminal deletion on heterogeneity was assessed by cation exchange chromatography analysis using the purified H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody according to the method described below. The conditions of cation exchange chromatography analysis are described below. Chromatograms for humanized PM-1 antibody, H chain C-terminal  $\Delta$ K antibody, and H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody were compared.

Column: ProPac WCX-10, 4 x 250 mm (Dionex)

Mobile phase A: 25 mmol/l MES/NaOH, pH 6.1

B: 25 mmol/l MES/NaOH, 250 mmol/l NaCl, pH 6.1

Flow rate: 0.5 ml/min

Gradient: 25% B (5 min) -> (105 min) -> 67% B -> (1 min) -> 100% B (5 min)

Detection: 280 nm

The analysis result for the non-altered humanized PM-1 antibody, H chain C-terminal  $\Delta$ K antibody, and H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody is shown in Fig. 26. According to Non-patent Document 30, a basic peak with more prolonged retention time than that of the main peak contains an H chain C terminus with Lys at position 449 and an H chain C terminus with amidated Pro at position 447. The intensity of the basic peak was significantly reduced in the H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody, while no such significant reduction was observed in the H chain C-terminal  $\Delta$ K antibody. This suggests that the C-terminal heterogeneity of the H chain can be

reduced only when the two C-terminal amino acids are deleted from the H chain.

The temperature of thermal denaturation of the H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody was determined by DSC to assess the effect of the deletion of the two residues at the H chain C terminus on thermal stability. For the DSC measurement, the antibody was dialyzed against 20 mM acetic acid buffer (pH 6.0) containing 150 mM NaCl to change the buffer. After thorough deaeration, the humanized PM-1 antibody and H chain C-terminal  $\Delta$ GK antibody solutions, and the reference solution (outer dialysate) were enclosed in calorimetric cells, and thoroughly thermally equilibrated at 40°C. Then, the samples were scanned at from 40 to 100°C with a rate of about 1K/min. The resulting denaturation peaks were assigned (Rodolfo *et al.*, Immunology Letters, 1999, p 47-52). The result showed that the C-terminal deletion had no effect on the thermal denaturation temperature of CH3 domain.

Thus, the heterogeneity originated from the C-terminal amino acid can be reduced without affecting the thermal stability of antibody by deleting the C-terminal lysine and glycine from the H chain constant region at the nucleotide sequence level. Since all of the constant regions of human antibodies IgG1, IgG2, and IgG4 contain Gly and Lys at positions 446 and 447 in the EU numbering system in their C-terminal sequences, the method for reducing the C-terminal amino acid heterogeneity discovered in this example and others is also expected to be applicable to IgG2 and IgG4 constant regions and variants thereof.

#### 20 [Example 10] Construction of M14 $\Delta$ GK with a novel optimized constant region sequence

When an antibody pharmaceutical is aimed at neutralizing an antigen, effector functions such as ADCC of Fc domain are unnecessary and therefore the binding to Fc $\gamma$  receptor is unnecessary. The binding to Fc $\gamma$  receptor is assumed to be unfavorable from the perspectives of immunogenicity and adverse effect (Non-patent Documents 24 and 25). The humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB does not need to bind to Fc $\gamma$  receptor, because it only needs to specifically bind to IL-6 receptor and neutralize its biological activity in order to be used as a therapeutic agent for diseases associated with IL-6, such as rheumatoid arthritis.

#### 30 Construction and assessment of M14 $\Delta$ GK, a Fc $\gamma$ receptor-nonbinding, optimized constant region

A possible method for impairing the Fc $\gamma$  receptor binding is to convert the IgG antibody from IgG1 isotype to IgG2 or IgG4 isotype (Ann. Hematol. 1998 Jun;76(6):231-48). As a method for completely eliminating the binding to Fc $\gamma$  receptor, a method of introducing an artificial alteration into Fc domain has been reported. For example, since the effector functions of anti-CD3 antibody and anti-CD4 antibody cause adverse effects, amino acid mutations that are not present in the wild type sequence have been introduced into the Fc $\gamma$  receptor-binding



region of Fc domain (Non-patent Documents 26 and 27), and the resulting Fcγ receptor-nonbinding anti-CD3 and anti-CD4 antibodies are under clinical trials (Non-patent Documents 24 and 28). According to another report (Patent Document 6), Fcγ receptor-nonbinding antibodies can be prepared by converting the FcγR-binding domain of IgG1 (at positions 233, 234, 235, 236, 327, 330, and 331 in the EU numbering system) into the sequence of IgG2 (at positions 233, 234, 235, and 236 in the EU numbering system) or IgG4 (at positions 327, 330, and 331 in the EU numbering system). However, if all of the above mutations are introduced into IgG1, novel peptide sequences of nine amino acids, which potentially serve as non-natural T-cell epitope peptides, will be generated, and this increases the immunogenicity risk. The immunogenicity risk should be minimized in developing antibody pharmaceuticals.

To overcome the above problem, alterations in the IgG2 constant region were considered. In the FcγR-binding domain of IgG2 constant region, residues at positions 327, 330, and 331 in the EU numbering system are different from the nonbinding sequence of IgG4 while those at positions 233, 234, 235, and 236 in the EU numbering system are amino acids of nonbinding type. Thus, it is necessary to alter the amino acids at positions 327, 330, and 331 in the EU numbering system to the sequence of IgG4 (G2Δa described in Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24). However, since the amino acid at position 339 in the EU numbering system in IgG4 is alanine while the corresponding residue in IgG2 is threonine, a simple alteration of the amino acids at positions 327, 330, and 331 in the EU numbering system to the sequence of IgG4 unfavorably generates a novel peptide sequence of 9 amino acids, potentially serving as a non-natural T-cell epitope peptide, and thus increases the immunogenicity risk, which is unpreferable. Then, the present inventors found that the generation of novel peptide sequence could be prevented by introducing the substitution of alanine for threonine at position 339 in the EU numbering system in IgG2, in addition to the alteration described above.

In addition to the mutations described above, other mutations were introduced, and they were the substitution of valine for methionine at position 397 in the EU numbering system in IgG2, which was discovered in Example 7 to improve the stability of IgG2 under acidic condition; and the substitution of serine for cysteine at position 131 in the EU numbering system, the substitution of lysine for arginine at position 133 in the EU numbering system, and the substitution of serine for cysteine at position 219 in the EU numbering system, which were discovered in Example 8 to improve the heterogeneity originated from disulfide bonds in the hinge region. Furthermore, since the mutations at positions 131 and 133 generate a novel peptide sequence of 9 amino acids, potentially serving as a non-natural T-cell epitope peptide, and thus generate the immunogenicity risk, the peptide sequence around positions 131 to 139 was converted into a natural human sequence by introducing the substitution of glycine for

glutamic acid at position 137 in the EU numbering system and the substitution of glycine for serine at position 138 in the EU numbering system. Furthermore, glycine and lysine at positions 446 and 447 in the EU numbering system were deleted from the C terminus of H chain to reduce the C-terminal heterogeneity. The constant region sequence having all of the mutations introduced was named M14ΔGK (M14ΔGK, SEQ ID NO: 24). Although there is a mutation of cysteine at position 219 to serine in M14ΔGK as a novel 9-amino acid peptide sequence which potentially serves as a T-cell epitope peptide, the immunogenicity risk was considered very low since the amino acid property of serine is similar to that of cysteine. The immunogenicity prediction by TEPITOPE also suggested that there was no difference in immunogenicity.

An expression vector for the antibody H chain sequence whose variable region was WT and constant region was M14ΔGK (M14ΔGK, SEQ ID NO: 24; WT-M14ΔGK, SEQ ID NO: 113) was constructed by the method described in Example 1. An antibody having WT-M14ΔGK as H chain and WT as L chain was expressed and purified by the method described in Example 1.

Furthermore, WT-M17ΔGK (M17ΔGK, SEQ ID NO: 116; WT-M17ΔGK, SEQ ID NO: 115) was constructed with the same method by introducing mutations into the IgG1 constant region at positions 233, 234, 235, 236, 327, 330, 331, and 339 in the EU numbering system (G1Δab described in Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24) to impair the Fcγ receptor binding and by deleting the amino acids at positions 446 and 447 in the EU numbering system to reduce the C-terminal heterogeneity (Example 9). An expression vector for WT-M11ΔGK (M11ΔGK, SEQ ID NO: 25; WT-M11ΔGK, SEQ ID NO: 114) was constructed. In WT-M11ΔGK, mutations were introduced into the IgG4 constant region at positions 233, 234, 235, and 236 in the EU numbering system (G4Δb described in Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24; this alteration newly generates non-human sequence and thus increases the immunogenicity risk) to reduce the Fcγ receptor binding. In addition to the above alteration, to reduce the immunogenicity risk, mutations were introduced at positions 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221, and 222 in the EU numbering system so that the pattern of disulfide bonding in the hinge region was the same as that of M14ΔGK; a mutation was introduced at position 409 in the EU numbering system (Example 7) to improve the stability under acidic condition; and the amino acids at positions 446 and 447 in the EU numbering system were deleted (Example 9) to reduce the C-terminal heterogeneity. WT-M17ΔGK or WT-M11ΔGK was used as the H chain, and WT was used as the L chain. These antibodies were expressed and purified by the method described in Example 1.

Assessment of WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK for Fcγ receptor binding

The FcγRI binding was assessed by the procedure described below. Using Biacore T100, human-derived Fcγ receptor I (hereinafter FcγRI) immobilized onto a sensor chip was allowed to interact with IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, or M17ΔGK as an analyte. The amounts of bound antibody were compared. The measurement was conducted using  
5 Recombinant Human FcRIA/CD64 (R&D systems) as human-derived FcγRI, and IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK as samples. FcγRI was immobilized onto the sensor chip CM5 (BIACORE) by the amine coupling method. The final amount of immobilized hFcγRI was about 13000 RU. The running buffer used was HBS-EP+, and the flow rate was 20 μl/min. The sample concentration was adjusted to 100 μg/ml using HBS-EP+. The  
10 analysis included two steps: two minutes of association phase where 10 μl of an antibody solution was injected and the subsequent four minutes of dissociation phase where the injection was switched with HBS-EP+. After the dissociation phase, the sensor chip was regenerated by injecting 20 μl of 5 mM sodium hydroxide. The association, dissociation, and regeneration constitute one analysis cycle. Various antibody solutions were injected to obtain sensorgrams.  
15 As analytes, IgG4, IgG2, IgG1, M11, M14, and M17 were injected in this order. This series of injection was repeated twice. The result of comparison of data on the determined amounts of bound antibody is shown in Fig. 27. The comparison shows that the amount of bound antibody is reduced in the order of: IgG1 > IgG4 >> IgG2 = M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Thus, it was revealed that the FcγRI binding of wild type IgG2, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK was  
20 weaker than that of wild type IgG1 and IgG4.

The FcγRIIa binding was assessed by the procedure described below. Using Biacore T100, human-derived Fcγ receptor IIa (hereinafter FcγRIIa) immobilized onto a sensor chip was allowed to interact with IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, or M17ΔGK as an analyte. The amounts of bound antibody were compared. The measurement was conducted using  
25 Recombinant Human FcRIIA/CD32a (R&D systems) as human-derived FcγRIIa, and IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK as samples. FcγRIIa was immobilized onto the sensor chip CM5 (BIACORE) by the amine coupling method. The final amount of immobilized FcγRIIa was about 3300 RU. The running buffer used was HBS-EP+, and the flow rate was 20 μl/min. Then, the running buffer was injected until the baseline was stabilized.  
30 The measurement was carried out after the baseline was stabilized. The immobilized FcγRIIa was allowed to interact with an antibody of each IgG isotype (IgG1, IgG2, or IgG4) or antibody introduced with mutations (M11ΔGK, M14ΔGK, or M17ΔGK) as an analyte. The amount of bound antibody was observed. The running buffer used was HBS-EP+, and the flow rate was 20 μl/min. The measurement temperature was 25°C. The concentration of each IgG or  
35 altered form thereof was adjusted to 100 μg/ml. 20 μl of an analyte was injected and allowed to interact with the immobilized FcγRIIa. After interaction, the analyte was dissociated from



FcγRIIa and the sensor chip was regenerated by injecting 200 μl of the running buffer. As analytes, IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK were injected in this order. This series of injection was repeated twice. The result of comparison of data on the amounts of bound antibody determined is shown in Fig. 28. The comparison shows that the amount of bound antibody is reduced in the order of: IgG1 > IgG2 = IgG4 > M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Thus, it was revealed that the FcγRIIa binding of M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK was weaker than that of wild type IgG1, IgG2, and IgG4.

The FcγRIIb binding was assessed by the procedure described below. Using Biacore T100, human-derived Fcγ receptor IIb (hereinafter FcγRIIb) immobilized onto a sensor chip was allowed to interact with IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, or M17ΔGK as an analyte. The amounts of bound antibody were compared. The measurement was conducted using Recombinant Human FcRIIB/C (R&D systems) as human-derived FcγRIIb, and IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK as samples. FcγRIIb was immobilized onto the sensor chip CM5 (BIACORE) by the amine coupling method. The final amount of immobilized FcγRIIb was about 4300 RU. Then, the running buffer was injected until the baseline was stabilized. The measurement was carried out after the baseline was stabilized. The immobilized FcγRIIb was allowed to interact with an antibody of each IgG isotype (IgG1, IgG2, or IgG4) or antibody introduced with mutations (M11ΔGK, M14ΔGK, or M17ΔGK) as an analyte. The amount of bound antibody was observed. The running buffer used was HBS-EP+ (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% v/v Surfactant P20), and the flow rate was 20 μl/min. The measurement temperature was 25°C. The concentration of each IgG or altered form thereof was adjusted to 200 μg/ml. 20 μl of an analyte was injected and allowed to interact with the immobilized FcγRIIb. After interaction, the analyte was dissociated from FcγRIIb and the sensor chip was regenerated by injecting 200 μl of the running buffer. As analytes, IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK were injected in this order. This series of injection was repeated twice. The result of comparison of data on the amounts of bound antibody determined is shown in Fig. 29. The comparison shows that the amount of bound antibody is reduced in the order of: IgG4 > IgG1 > IgG2 > M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Thus, it was revealed that the FcγRIIb binding of M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK was weaker than that of wild type IgG1, IgG2, and IgG4.

The FcγRIIIa binding was assessed by the procedure described below. Using Biacore T100, human-derived Fcγ receptor IIIa (hereinafter FcγRIIIa) immobilized onto a sensor chip was allowed to interact with IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, or M17ΔGK as an analyte. The amounts of bound antibody were compared. The measurement was conducted using hFcγRIIIaV-His6 (recombinant hFcγRIIIaV-His6 prepared in the applicants' company) as human-derived FcγRIIIa, and IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK as samples.



FcγRIIIa was immobilized onto the sensor chip CM5 (BIACORE) by the amine coupling method. The final amount of immobilized hFcγRIIIaV-His6 was about 8200 RU. The running buffer used was HBS-EP+, and the flow rate was 5 μl/min. The sample concentration was adjusted to 250 μg/ml using HBS-EP+. The analysis included two steps: two minutes of association phase where 10 μl of an antibody solution was injected and the subsequent four minutes of dissociation phase where the injection was switched with HBS-EP+. After the dissociation phase, the sensor chip was regenerated by injecting 20 μl of 5 mM hydrochloric acid. The association, dissociation, and regeneration constitute one analysis cycle. Various antibody solutions were injected to obtain sensorgrams. As analytes, IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK were injected in this order. The result of comparison of data on the determined amounts of bound antibody is shown in Fig. 30. The comparison shows that the amount of bound antibody is reduced in the order of: IgG1 >> IgG4 > IgG2 > M17ΔGK > M11ΔGK = M14ΔGK. Thus, it was revealed that the FcγRIIIa binding of M11ΔGK, M14ΔGK, and M17ΔGK was weaker than that of wild type IgG1, IgG2, and IgG4. Furthermore, the FcγRIIIa binding of M11ΔGK and M14ΔGK was found to be weaker than that of M17ΔGK containing the mutation G1Δab reported in Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24.

The finding described above demonstrates that the Fcγ receptor binding of WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK is markedly reduced as compared to wild type IgG1. The immunogenicity risk due to Fcγ receptor-mediated internalization into APC and adverse effects caused by the effector function such as ADCC can be avoided by using WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, or WT-M11ΔGK as a constant region. Thus, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK are useful as constant region sequence of antibody pharmaceuticals aimed at neutralizing antigens.

#### 25 Assessment of WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK for stability at high concentrations

WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK were assessed for stability at high concentrations. The purified antibodies of WT-IgG1, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK were dialyzed against a solution of 20 mM histidine chloride, 150 mM NaCl, pH 6.5 (EasySEP, TOMY), and then concentrated by ultrafilters. The antibodies were tested for stability at high concentrations. The conditions were as follows.

Antibodies: WT-IgG1, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK

Buffer: 20 mM histidine chloride, 150 mM NaCl, pH 6.5

Concentration: 61 mg/ml

35 Storage temperature and time period: 40°C for two weeks, 40°C for one month, 40°C for two months

Aggregation assessment method:

System: Waters Alliance

Column: G3000SWxl (TOSOH)

Mobile phase: 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0

5 Flow rate, wavelength: 0.5 ml/min, 220 nm

100 times diluted samples were analyzed

The contents of aggregate in the initial formulations (immediately after preparation) and formulations stored under various conditions were estimated by gel filtration chromatography described above. Differences (amounts increased) in the content of aggregate relative to the initial formulations are shown in Fig. 31. The result showed that the amounts of aggregate in WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, and WT-M11ΔGK increased only slightly as compared to WT-IgG1 and were about half of the content in WT. Furthermore, as shown in Fig. 32, the amount of increased Fab fragment was comparable between WT-IgG1 and WT-M17ΔGK, while the amounts increased in WT-M14ΔGK and WT-M11ΔGK were about one quarter of the amount in WT. Degeneration pathways of IgG type antibody formulations include formation of aggregate and generation of Fab degradate as described in WO 2003/039485. Based on the two criteria, aggregation and Fab fragment generation, WT-M14ΔGK and WT-M11ΔGK were demonstrated to have a superior stability in formulations as compared to WT-IgG1. Thus, even for antibodies that have an IgG1 constant region with poor stability and could not be prepared as antibody pharmaceuticals in high-concentration liquid formulations, the use of WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, or WT-M11ΔGK as a constant region was expected to allow production of more stable high-concentration liquid formulations.

In particular, M14ΔGK was expected to be very useful as a novel constant region sequence that would (1) overcome the instability of the original IgG2 molecule under acidic condition; (2) improve the heterogeneity originated from disulfide bonds in the hinge region; (3) not bind to Fcγ receptor; (4) have a minimized number of novel peptide sequences of 9 amino acids which potentially serve as T-cell epitope peptides; and (5) have a better stability than IgG1 in high-concentration formulations.

### 30 [Example 11] Preparation of PF1-M14ΔGK antibody

The variable region of PF1 (whose constant region is IgG1) constructed in Example 5 was excised using *Xho*I and *Nhe*I. The constant region of M14ΔGK (whose variable region is WT) constructed in Example 7 was excised using *Nhe*I and *Not*I. The two antibody H chain gene fragments were inserted into an animal cell expression vector to construct an expression vector for the H chain of interest, PF1-M14ΔGK (PF1\_H-M14ΔGK, SEQ ID NO: 117). The L chain used was PF1\_L. The antibody PF1-M14ΔGK was expressed and purified by the method

described in Example 1.

The antibody PF1-M14ΔGK was superior in various aspects as compared to WT (humanized PM-1 antibody) and thus expected to be very useful as anti-IL-6 receptor antibody pharmaceuticals.

5

[Example 12] Preparation and assessment of M31ΔGK

M14ΔGK prepared in Example 10 was altered by substituting the IgG2 sequence for the amino acids at positions 330, 331, and 339 in the EU numbering system to construct M31ΔGK (M31ΔGK, SEQ ID NO: 118). An expression vector for a sequence of antibody H chain whose variable region is WT and constant region sequence is M31ΔGK (WT-M31ΔGK, SEQ ID NO: 119) was constructed by the method described in Example 1. Using WT-M31ΔGK H chain and WT L chain, WT-M31 was expressed and purified by the method described in Example 1.

In addition to WT-M31, WT-IgG2 and WT-M14ΔGK were expressed and purified at the same time, and analyzed by cation exchange chromatography by the procedure described below. The conditions used in the cation exchange chromatography analysis were as follows. Chromatograms for WT-IgG2, WT-M14ΔGK, and WT-M31ΔGK were compared.

Column: ProPac WCX-10, 4 x 250 mm (Dionex)  
 Mobile phase    A: 25 mmol/l MES/NaOH, pH 6.1  
                              B: 25 mmol/l MES/NaOH, 250 mmol/l NaCl, pH 6.1  
 Flow rate: 0.5 ml/min  
 Gradient: 0% B (5 min) -> (65 min) -> 100% B -> (1 min)  
 Detection: 280 nm

The analysis result for WT-IgG2, WT-M14ΔGK, and WT-M31ΔGK is shown in Fig. 33. Like WT-M14ΔGK, WT-M31ΔGK was demonstrated to be eluted as a single peak, while WT-IgG2 gave multiple peaks. This indicates that the heterogeneity derived from disulfide bonds in the hinge region of IgG2 can also be avoided in WT-M31ΔGK.

[Example 13] Preparation of a fully humanized antibody F2H/L39-IgG1

30 Full humanization of the framework sequence of the PF1 antibody

Arginine at position 71 (Kabat's numbering system; Kabat EA *et al.* 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH) is the only mouse sequence that remains in PF1\_H prepared in Example 5. This is unpreferable from the perspective of immunogenicity. In general, the residue at position 71 in the H chain is an important sequence for the conformation of HCDR2. In fact, it has been reported that during generation of the humanized PM1 antibody, the residue at position 71 is essential for the binding activity of mouse PM1 antibody. The

35

binding activity was demonstrated to be significantly reduced by substituting valine at position 71 (Cancer Research 53, 851-856, 1993). Meanwhile, PF1\_H is classified into the VH4 family of human germ line genes, and valine at position 71 is highly conserved in the VH4 family. The neutralizing activity was also demonstrated to be significantly reduced by substituting valine for arginine at position 71.

Thus, to completely remove the mouse sequence while maintaining the arginine at position 71, the present inventors searched among sequences of human germ line genes and reported human antibodies for sequences that have arginine at position 71 and share conserved residues important for the maintenance of antibody tertiary structure. As a result, the inventors discovered a candidate sequence which contains important conserved residues although its homology to PF1\_H is low as shown in Table 9.

Table 9

KABAT NUMBERING	6666777788889999101011111212131314141515161617171818191920202121222223232424252526262727282829293030313132323333343435353636373738383939404041414242434344444545464647474848494950505151525253535454	source
PF1_H CANDIDATE SEQUENCE	RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAAYYCAR RVTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	Germline: IMGT_hvH_4_b (EXCEPT H71&H89) Mol. Immunol. 44(4):412-422 (2007)

H96-IgG1 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 134) was designed by substituting the above-described candidate sequence for the region of positions 66 to 94 in PF1\_H-IgG1, Kabat's numbering. The antibody variable region was prepared by PCR (assembly PCR) using a combination of synthetic oligo-DNAs. The constant region was amplified from an expression vector for IgG1 by PCR. The antibody variable region and constant region were linked together by assembly PCR, and then inserted into an animal cell expression vector. H96/PF1L-IgG1 was expressed and purified by the method described in Example 1.

Assessment of H96/PF1L-IgG1, an antibody with fully humanized framework

The Tm of purified H96/PF1L-IgG1 was determined by the method described in Example 5. The affinity measurement was carried out under essentially the same conditions used in Example 5. Note that the concentration of SR344 was adjusted to 0, 0.36, and 1.4 µg/ml, and the dissociation phase was monitored for 15 minutes. The result showed that the Tm and affinity of H96/PF1L-IgG1 were almost the same as those of PF1-IgG1 (Table 10).



Table 10

	T <sub>m</sub> (°C)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	KD (M)
PF1 ANTIBODY	91.3	1.4E+06	4.2E-05	3.1E-11
H96/PF1L-IgG1	89.8	1.2E+06	4.8E-05	3.9E-11

As described above, the present inventors generated an antibody with a fully humanized PF1 antibody framework, using H96 for the PF1 antibody H chain to completely remove the remaining mouse sequence from the PF1 antibody while maintaining its T<sub>m</sub> and affinity. Since the framework sequence of H96/PF1L-IgG1 has no mouse-derived sequence, H96/PF1L-IgG1 is expected to be superior, especially from the perspective of immunogenicity.

#### Construction of F2H/L39-IgG1 with lowered pI and attenuated immunogenicity risk

As demonstrated in Example 4, the pharmacokinetics can be enhanced by lowering pI through alteration of amino acids in the antibody variable region. Thus, the amino acid substitutions shown below were further introduced into H96-IgG1 constructed above. To lower pI, glutamine was substituted for lysine at position 64, and aspartic acid was substituted for glycine at position 65. Furthermore, to reduce the immunogenicity risk, glutamine was substituted for glutamic acid at position 105 and isoleucine was substituted for threonine at position 107. In addition, to achieve affinity enhancement such as that in Example 2, alternation was introduced where leucine was substituted for valine at position 95 and alanine was substituted for isoleucine at position 99. To prepare F2H-IgG1 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 135), these amino acid substitutions were introduced into H96-IgG1 by the method described in Example 1.

Furthermore, the following amino acid substitutions were introduced into PF1L. To lower pI, glutamic acid was substituted for glutamine at position 27 and glutamic acid was substituted for leucine at position 55. To prepare L39 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 136), these amino acid substitutions were introduced into PF1L by the method described in Example 1. Using F2H-IgG1 as heavy chain and L39 as light chain, F2H/L39-IgG1 was expressed and purified by the method described in Example 1.

#### Biacore-based analysis of F2H/L39-IgG1 for the affinity for human IL-6 receptor

Humanized PM1 antibody (wild type (WT)), PF1 antibody (constructed in Example 5), and F2H/L39-IgG1 were analyzed for affinity. This measurement was carried out under essentially the same conditions used in Example 4. Note that the concentration of SR344 was adjusted to 0, 0.36, and 1.4 µg/ml, and the dissociation phase was monitored for 15 minutes (Table 11).

Table 11

SAMPLE	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
PF1-IgG1	1. 5E+06	4. 4E-05	3. 0E-11
F2H/L39-IgG1	7. 7E+05	4. 0E-05	5. 2E-11

The result showed that F2H/L39-IgG1 had very strong affinity (maintaining a KD in the order of  $10^{-11}$ ) but its  $k_a$  was decreased to about half of that of PF1-IgG1.

Assessment of F2H/L39-IgG1 for its human IL-6 receptor-neutralizing activity

The neutralizing activities of humanized PM1 antibody (wild type (WT)) and F2H/L39-IgG1 were assessed by the method described in Example 1. The assessment of neutralizing activity was carried out using 600 ng/ml human interleukin-6 (TORAY). As shown in Fig. 34, F2H/L39-IgG1 was demonstrated to have a very strong activity, 100 or more times higher than WT in terms of 100% inhibitory concentration.

Assessment of F2H/L39-IgG1 for its isoelectric point by isoelectric focusing

The isoelectric point of F2H/L39-IgG1 was determined by the method described in Example 3. The isoelectric point of F2H/L39-IgG1 was 5.5, suggesting that its pharmacokinetics was improved due to a lower isoelectric point relative to the PF1 antibody prepared in Example 5.

The theoretical isoelectric point of the variable regions of F2H/L39 (VH and VL sequences) was calculated to be 4.3 by using GENETYX (GENETYX CORPORATION). Meanwhile, the theoretical isoelectric point of WT was 9.20. Thus, WT has been converted through amino acid substitution into F2H/L39 which has a variable region with a theoretical isoelectric point decreased by about 4.9.

PK/PD test of F2H/L39-IgG1 using cynomolgus monkeys

The humanized PM1 antibody (wild type (WT)), PF1 antibody, and F2H/L39-IgG1 were assessed for their pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) in cynomolgus monkeys. WT, PF1, and F2H/L39-IgG1 were subcutaneously administered once at 1.0 mg/kg, and blood was collected before administration and over the time course. The concentration of each antibody in plasma was determined in the same way as described in Example 6. The plasma concentration time courses of WT, PF1, and F2H/L39-IgG1 are shown in Fig. 35. The efficacy of each antibody to neutralize membrane-bound cynomolgus monkey IL-6 receptor was assessed. Cynomolgus monkey IL-6 was administered subcutaneously in the lower back at 5

µg/kg every day from Day 3 to Day 10 after antibody administration, and the CRP concentration in each animal was determined 24 hours later. The time courses of CRP concentration after administration of WT or F2H/L39 are shown in Fig. 36. To assess the efficacy of each antibody to neutralize soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor, the concentration of free soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor in the plasma of cynomolgus monkeys was determined. The time courses of free soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor concentration after administration of WT or F2H/L39 are shown in Fig. 37.

These results showed that the plasma concentration time courses of WT and PF1 were comparable to each other; however, the plasma concentration of F2H/L39-IgG1, which has a lowered pI, was maintained higher than that of these two antibodies. Meanwhile, when compared to WT, F2H/L39-IgG1 which has a high affinity for IL-6 receptor was found to maintain lower concentrations of CRP and free soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor.

[Example 14] Assessment of the plasma retention of WT-M14

#### Method for estimating the retention in human plasma

The prolonged retention (slow elimination) of IgG molecule in plasma is known to be due to the function of FcRn which is known as a salvage receptor of IgG molecule (Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep;7(9):715-25). When taken up into endosomes via pinocytosis, under the acidic conditions within endosome (approx. pH 6.0), IgG molecules bind to FcRn expressed in endosomes. While IgG molecules that do not bind to FcRn are transferred and degraded in lysosomes, those bound to FcRn are translocated to the cell surface and then released from FcRn back into plasma again under the neutral conditions in plasma (approx. pH 7.4).

Known IgG-type antibodies include the IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 isotypes. The plasma half-lives of these isotypes in human are reported to be about 36 days for IgG1 and IgG2; about 29 days for IgG3; and 16 days for IgG4 (Nat. Biotechnol. 2007 Dec; 25(12):1369-72). Thus, the retention of IgG1 and IgG2 in plasma is believed to be the longest. In general, the isotypes of antibodies used as pharmaceutical agents are IgG1, IgG2, and IgG4. Methods reported for further improving the pharmacokinetics of these IgG antibodies include methods for improving the above-described binding to human FcRn, and this is achieved by altering the sequence of IgG constant region (J. Biol. Chem. 2007 Jan 19;282(3):1709-17; J. Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56).

There are species-specific differences between mouse FcRn and human FcRn (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Dec 5;103(49):18709-14). Therefore, to predict the plasma retention of IgG antibodies that have an altered constant region sequence in human, it is desirable to assess the binding to human FcRn and retention in plasma in human FcRn transgenic

mice (Int. Immunol. 2006 Dec;18(12):1759-69).

#### Assessment of the binding to human FcRn

FcRn is a complex of FcRn and  $\beta$ 2-microglobulin. Oligo-DNA primers were prepared  
5 based on the human FcRn gene sequence disclosed (J. Exp. Med. (1994) 180 (6), 2377-2381).  
A DNA fragment encoding the whole gene was prepared by PCR using human cDNA (Human  
Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) as a template and the prepared primers. Using the  
obtained DNA fragment as a template, a DNA fragment encoding the extracellular domain  
containing the signal region (Met1-Leu290) was amplified by PCR, and inserted into an animal  
10 cell expression vector (the amino acid sequence of human FcRn as set forth in SEQ ID NO: 140).  
Likewise, oligo-DNA primers were prepared based on the human  $\beta$ 2-microglobulin gene  
sequence disclosed (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2002) 99 (26), 16899-16903). A DNA  
fragment encoding the whole gene was prepared by PCR using human cDNA (Hu-Placenta  
Marathon-Ready cDNA, CLONTECH) as a template and the prepared primers. Using the  
15 obtained DNA fragment as a template, a DNA fragment encoding the whole  $\beta$ 2-microglobulin  
containing the signal region (Met1-Met119) was amplified by PCR and inserted into an animal  
cell expression vector (the amino acid sequence of human  $\beta$ 2-microglobulin as set forth in SEQ  
ID NO: 141).

Soluble human FcRn was expressed by the following procedure. The plasmids  
20 constructed for human FcRn and  $\beta$ 2-microglobulin were introduced into cells of the human  
embryonic kidney cancer-derived cell line HEK293H (Invitrogen) using 10% Fetal Bovine  
Serum (Invitrogen) by lipofection. The resulting culture supernatant was collected, and FcRn  
was purified using IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) by the method described  
in J. Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80, followed by further purification using HiTrap Q HP  
25 (GE Healthcare).

The binding to human FcRn was assessed using Biacore 3000. An antibody was  
bound to Protein L or rabbit anti-human IgG Kappa chain antibody immobilized onto a sensor  
chip, human FcRn was added as an analyte for interaction with the antibody, and the affinity  
(KD) was calculated from the amount of bound human FcRn. Specifically, Protein L or rabbit  
30 anti-human IgG Kappa chain antibody was immobilized onto sensor chip CM5 (BIACORE) by  
the amine coupling method using 50 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0) containing 150 mM  
NaCl as the running buffer. Then, an antibody was diluted with a running buffer containing  
0.02% Tween20, and injected to be bound to the chip. Human FcRn was then injected and the  
binding of the human FcRn to antibody was assessed.

35 The affinity was computed using BIAevaluation Software. The obtained sensorgram  
was used to calculate the amount of hFcRn bound to the antibody immediately before the end of



human FcRn injection. The affinity of the antibody for human FcRn was calculated by fitting with the steady state affinity method.

#### Assessment for the plasma retention in human FcRn transgenic mice

5 The pharmacokinetics in human FcRn transgenic mice (B6.mFcRn-/-hFcRn Tg line 276 +/+ mice; Jackson Laboratories) was assessed by the following procedure. An antibody was intravenously administered once at a dose of 1 mg/kg to mice, and blood was collected at appropriate time points. The collected blood was immediately centrifuged at 15,000 rpm and 4°C for 15 minutes to obtain blood plasma. The separated plasma was stored in a freezer at 10 -20°C or below until use. The plasma concentration was determined by ELISA.

#### Predictive assessment of the plasma retention of WT-M14 in human

The bindings of WT-IgG1 and WT-M14 to bind to human FcRn were assessed by BIAcore. As shown in Table 12, the result indicated that the binding of WT-M14 was slightly 15 greater than that of WT-IgG1.

Table 12

	KD(μM)
WT-IgG1	2.07
WT-M14	1.85

As shown in Fig. 38, however, the retention in plasma was comparable between 20 WT-IgG1 and WT-M14 when assessed using human FcRn transgenic mice. This finding suggests that the plasma retention of the M14 constant region in human is comparable to that of the IgG1 constant region.

[Example 15] Preparation of WT-M44, WT-M58, and WT-M73 which have improved 25 pharmacokinetics

#### Preparation of the WT-M58 molecule

As described in Example 14, the plasma retention of WT-M14 in human FcRn transgenic mice was comparable to that of WT-IgG1. Known methods to improve 30 pharmacokinetics include those to lower the isoelectric point of an antibody and those to enhance the binding to FcRn. Here, the modifications described below were introduced to improve the pharmacokinetics of WT-M14. Specifically, the following substitutions were introduced into WT-M31ΔGK, which was prepared from WT-M14 as described in Example 4: substitution of methionine for valine at position 397; substitution of glutamine for histidine at position 268;

substitution of glutamine for arginine at position 355; and substitution of glutamic acid for glutamine at position 419 in the EU numbering system. These four substitutions were introduced into WT-M31 $\Delta$ GK to generate WT-M58 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 142). Expression vectors were prepared by the same method described in Example 1. WT-M58 and L(WT) were used as H chain and L chain, respectively. WT-M58 was expressed and purified by the method described in Example 1.

#### Construction of the WT-M73 molecule

On the other hand, WT-M44 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 143) was generated by introducing into IgG1 a substitution of alanine for the amino acid at position 434, EU numbering. WT-M83 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 185) was also generated by deletions of glycine at position 446, EU numbering and lysine at position 447, EU numbering to reduce H chain C-terminal heterogeneity. Furthermore, WT-M73 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 144) was generated by introducing into WT-M58 a substitution of alanine at position 434, EU numbering.

Expression vectors for the above antibodies were constructed by the method described in Example 1. WT-M44, WT-M58, or WT-M73 was used as H chain, while L (WT) was used as L chain. WT-M44, WT-M58, and WT-M73 were expressed and purified by the method described in Example 1.

#### Predictive assessment of the plasma retention of WT-M44, WT-M58, and WT-M73 in human

The bindings of WT-IgG1, WT-M44, WT-M58, and WT-M73 to human FcRn were assessed by BIAcore. As shown in Table 13, the result indicates that the bindings of WT-M44, WT-M58, and WT-M73 are greater than WT-IgG1, and about 2.7, 1.4, and 3.8 times of that of WT-IgG1, respectively.

Table 13

	KD( $\mu$ M)
WT-IgG1	1.62
WT-M44	0.59
WT-M58	1.17
WT-M73	0.42

As a result of assessing WT-IgG1, WT-M44, and WT-M58 for their plasma retention in human FcRn transgenic mice, as shown in Fig. 39, WT-M58 was confirmed to have increased retention in plasma relative to WT-IgG1 and WT-M44. Furthermore, WT-IgG1, WT-M44, WT-M58, and WT-M73 were assessed for their plasma retention in human FcRn transgenic mice.

As shown in Fig. 40, all of WT-M44, WT-M58, and WT-M73 were confirmed to have improved pharmacokinetics relative to WT-IgG1. The pharmacokinetics-improving effect correlated with the binding activity to human FcRn. In particular, the plasma level of WT-M73 at Day 28 was improved to about 16 times of that of WT-IgG1. This finding suggests that the pharmacokinetics of antibodies with the M73 constant region in human is also significantly enhanced when compared to antibodies with the IgG1 constant region.

[Example 16] Effect of the novel constant regions M14 and M58 in reducing heterogeneity in various antibodies

As described in Example 8, it was demonstrated that the heterogeneity originated from the hinge region of IgG2 could be reduced by converting the IgG2 constant region to M14 in the humanized anti-IL-6 receptor PM1 antibody (WT). IgG2 type antibodies other than the humanized PM1 antibody were also tested to assess whether the heterogeneity can be reduced by converting their constant regions into M14 or M58.

Antibodies other than the humanized PM1 antibody were: the anti IL-6 receptor antibody F2H/L39 (the amino acid sequences of F2H/L39\_VH and F2H/L39\_VL as set forth in SEQ ID NOs: 145 and 146, respectively); anti-IL-31 receptor antibody H0L0 (the amino acid sequences of H0L0\_VH and H0L0\_VL as set forth in SEQ ID NOs: 147 and 148, respectively); and anti-RANKL antibody DNS (the amino acid sequences of DNS\_VH and DNS\_VL as set forth in SEQ ID NOs: 149 and 150, respectively). For each of these antibodies, antibodies with IgG1 constant region (SEQ ID NO: 19), IgG2 constant region (SEQ ID NO: 20), or M14 (SEQ ID NO: 24) or M58 (SEQ ID NO: 151) were generated.

The generated antibodies were assessed for heterogeneity by cation exchange chromatography using an adequate gradient and an appropriate flow rate on a ProPac WCX-10 (Dionex) column (mobile phase A: 20 mM sodium acetate (pH 5.0), mobile phase B: 20 mM sodium acetate/1M NaCl (pH 5.0)). The assessment result obtained by cation exchange chromatography (IEC) is shown in Fig. 41.

As shown in Fig. 41, conversion of the constant region from an IgG1 type into an IgG2 type was demonstrated to increase heterogeneity not only in the humanized anti-IL-6 receptor PM1 antibody (WT), but also in the anti-IL-6 receptor antibody F2H/L39, anti-IL-31 receptor antibody H0L0, and anti-RANKL antibody DNS. In contrast, heterogeneity could be decreased in all of these antibodies by converting their constant region into M14 or M58. Thus, it was demonstrated that, regardless of the type of antigen or antibody variable region sequence, the heterogeneity originated from natural IgG2 could be reduced by substituting serines for cysteines at position 131, EU numbering, in the H-chain CH1 domain and at position 219, EU numbering, in the upper hinge of H chain.

[Example 17] Effect of the novel constant region M58 to improve the pharmacokinetics in various antibodies

As described in Example 15, it was demonstrated that conversion of the constant region from IgG1 into M58 in the humanized anti-IL-6 receptor PM1 antibody (WT) improved the binding to human FcRn and pharmacokinetics in human FcRn transgenic mice. So, IgG1 type antibodies other than the humanized PM1 antibody were also tested to assess whether their pharmacokinetics can be improved by converting their constant region into M58.

Antibodies other than the humanized PM1 antibody (WT) were the anti-IL-31 receptor antibody H0L0 (the amino acid sequences of H0L0\_VH and H0L0\_VL as set forth in SEQ ID NOs: 147 and 148, respectively) and anti-RANKL antibody DNS (the amino acid sequences of DNS\_VH and DNS\_VL as set forth in SEQ ID NOs: 149 and 150, respectively). For each of these antibodies, antibodies with IgG1 constant region (SEQ ID NO: 19) or M58 (SEQ ID NO: 151) were generated, and assessed for their binding to human FcRn by the method described in Example 14. The result is shown in Table 14.

Table 14

	KD ( $\mu$ M)		
	WT	H0L0	DNS
IgG1	1.42	1.07	1.36
M58	1.03	0.91	1.03

As shown in Table 14, it was demonstrated that as a result of conversion of the constant region from the IgG1 type to M58, as with anti-IL-6 receptor antibody WT, the bindings of both the anti-IL-31 receptor antibody H0L0 and anti-RANKL antibody DNS to human FcRn were improved. This suggests the possibility that regardless of the type of antigen or sequence of antibody variable region, the pharmacokinetics in human is improved by converting the constant region from the IgG1 type to M58.

[Example 18] Effect of cysteine in the CH1 domain on heterogeneity and stability

As described in Example 8, cysteines in the hinge region and CH1 domain of IgG2 were substituted to decrease the heterogeneity of natural IgG2. Assessment of various altered antibodies revealed that heterogeneity could be reduced without decreasing stability by using SKSC (SEQ ID NO: 154). SKSC (SEQ ID NO: 154) is an altered constant region obtained by substituting serine for cysteine at position 131 and lysine for arginine at position 133, EU numbering, in the H-chain CH1 domain, and serine for cysteine at position 219, EU numbering,



in the H-chain upper hinge of the wild type IgG2 constant region sequence.

Meanwhile, another possible method for decreasing heterogeneity is a single substitution of serine for cysteine at position 219, or serine for cysteine at position 220, EU numbering, in the H-chain upper hinge. The altered IgG2 constant region SC (SEQ ID NO: 155) was prepared by substituting serine for cysteine at position 219 and CS (SEQ ID NO: 156) was prepared by substituting serine for cysteine at position 220, EU numbering, in IgG2.

WT-SC (SEQ ID NO: 157) and WT-CS (SEQ ID NO: 158) were prepared to have SC and CS, respectively, and compared with WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SKSC, and WT-M58 in terms of heterogeneity and thermal stability. Furthermore, F2H/L39-IgG1, F2H/L39-IgG2, F2H/L39-SC, F2H/L39-CS, F2H/L39-SKSC, and F2H/L39-M14, which have the constant region of IgG1 (SEQ ID NO: 19), IgG2 (SEQ ID NO: 20), SC (SEQ ID NO: 155), CS (SEQ ID NO: 156), SKSC (SEQ ID NO: 154), or M14 (SEQ ID NO: 24), respectively, were prepared from F2H/L39 (the amino acid sequences of F2H/L39\_VH and F2H/L39\_VL as set forth in SEQ ID NOs: 145 and 146, respectively), which is an anti IL-6 receptor antibody different from WT.

The antibodies were compared with regard to heterogeneity and stability.

WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SC, WT-CS, WT-SKSC, WT-M58, F2H/L39-IgG1, F2H/L39-IgG2, F2H/L39-SC, F2H/L39-CS, F2H/L39-SKSC, and F2H/L39-M14 were assessed for heterogeneity by cation exchange chromatography using an adequate gradient and an appropriate flow rate on a ProPac WCX-10 (Dionex) column (mobile phase A: 20 mM sodium acetate (pH 5.0), mobile phase B: 20 mM sodium acetate/1M NaCl (pH 5.0)). The assessment result obtained by cation exchange chromatography is shown in Fig. 42.

As shown in Fig.42, conversion of the constant region from an IgG1 type to an IgG2 type was demonstrated to increase heterogeneity in both WT and F2H/L39. In contrast, heterogeneity was significantly decreased by converting the constant region into SKSC and M14 or M58. Meanwhile, conversion of the constant region into SC significantly decreased heterogeneity, as in the case of SKSC. However, conversion into CS did not sufficiently improve heterogeneity.

In addition to low heterogeneity, high stability is generally desired when preparing stable formulations in development of antibody pharmaceuticals. Thus, to assess stability, the midpoint temperature of thermal denaturation (T<sub>m</sub> value) was determined by differential scanning calorimetry (DSC) (VP-DSC; Microcal). The midpoint temperature of thermal denaturation (T<sub>m</sub> value) serves as an indicator of stability. In order to prepare stable formulations as pharmaceutical agents, a higher midpoint temperature of thermal denaturation (T<sub>m</sub> value) is preferred (J. Pharm. Sci. 2008 Apr;97(4):1414-26). WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SC, WT-CS, WT-SKSC, and WT-M58 were dialyzed (EasySEP; TOMY) against a solution of 20 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, pH 6.0. DSC measurement was carried out at a

heating rate of 1°C/min in a range of 40 to 100°C, and at a protein concentration of about 0.1 mg/ml. The denaturation curves obtained by DSC are shown in Fig. 43. The  $T_m$  values of the Fab domains are listed in Table 15 below.

5 Table 15

	$T_m/^\circ\text{C}$
<b>WT-IgG1</b>	<b>94.8</b>
<b>WT-IgG2</b>	<b>93.9</b>
<b>WT-SC</b>	<b>86.7</b>
<b>WT-CS</b>	<b>86.4</b>
<b>WT-SKSC</b>	<b>93.7</b>
<b>WT-M58</b>	<b>93.7</b>

The  $T_m$  values of WT-IgG1 and WT-IgG2 were almost the same (about 94°C;  $T_m$  of IgG2 was about 1°C lower). Meanwhile, the  $T_m$  values of WT-SC and WT-CS were about 86°C, and thus significantly lower than those of WT-IgG1 and WT-IgG2. On the other hand, the  $T_m$  values of WT-M58 and WT-SKSC were about 94°C, and comparable to those of WT-IgG1 and WT-IgG2. This suggests that WT-SC and WT-CS are markedly unstable as compared to IgG2, and thus, WT-SKSC and WT-M58, both of which also comprise substitution of serine for cysteine in the CH1 domain, are preferred in the development of antibody pharmaceuticals. The reason for the significant decrease of  $T_m$  in WT-SC and WT-CS relative to IgG2 is thought to be differences in the disulfide-bonding pattern between WT-SC or WT-CS and IgG2.

Furthermore, comparison of DSC denaturation curves showed that WT-IgG1, WT-SKSC, and WT-M58 each gave a sharp and single denaturation peak for the Fab domain. In contrast, WT-SC and WT-CS each gave a broader denaturation peak for the Fab domain. WT-IgG2 also gave a shoulder peak on the lower temperature side of the Fab domain denaturation peak. In general, it is considered that a single component gives a sharp DSC denaturation peak, and when two or more components with different  $T_m$  values (namely, heterogeneity) are present, the denaturation peak becomes broader. Specifically, the above-described result suggests the possibility that each of WT-IgG2, WT-SC, and WT-CS contains two or more components, and thus the natural-IgG2 heterogeneity has not been sufficiently reduced in WT-SC and WT-CS. This finding suggests that not only cysteines in the hinge region but also those in the CH1 domain are involved in the wild type-IgG2 heterogeneity, and it is necessary to alter not only cysteines in the hinge region but also those in the CH1 domain to decrease the DSC heterogeneity. Furthermore, as described above, stability comparable to that of wild type IgG2 can be achieved only when cysteines in both the hinge region and CH1 domain are substituted.

The above finding suggests that from the perspective of heterogeneity and stability, SC

and CS, which are constant regions introduced with serine substitution for only the hinge region cysteine, are insufficient as constant regions to decrease heterogeneity originated from the hinge region of IgG2. It was thus discovered that the heterogeneity could be significantly decreased while maintaining an IgG2-equivalent stability, only when the cysteine at position 131, EU  
5 numbering, in the CH1 domain was substituted with serine in addition to cysteine at hinge region. Such constant regions include M14, M31, M58, and M73 described above. In particular, M58 and M73 are stable and less heterogeneous, and exhibit improved pharmacokinetics, and therefore are expected to be very useful as constant regions for antibody pharmaceuticals.

10 [Example 19] Generation of fully humanized anti-IL-6 receptor antibodies with improved PK/PD

To generate a fully humanized anti-IL-6 receptor antibody with improved PK/PD, the molecules described below were created by altering TOCILIZUMAB (H chain, WT-IgG1 (SEQ ID NO: 15); L chain, WT (SEQ ID NO: 105).

To improve the  $k_a$  of F2H-IgG1, substitutions of valine for tryptophan at position 35,  
15 phenylalanine for tyrosine at position 50, and threonine for serine at position 62, which are the affinity enhancing substitution obtained in Example 2, were carried out. Furthermore, to lower pI without increasing immunogenicity risk, substitutions of valine for tyrosine at position 102, glutamic acid for glutamine at position 105, and threonine for isoleucine at position 107 were carried out, and conversion of the constant region from an IgG1 type to an M83 type was carried  
20 out and generated VH5-M83 (amino acid sequence of SEQ ID NO: 139). In addition, to improve the  $k_a$  of L39, VL5-kappa (amino acid sequence of SEQ ID NO: 181) was prepared and it comprises a substitution of glutamine for glutamic acid at position 27. Furthermore, TOCILIZUMAB variants were prepared by combining two or more of the mutations in variable and constant regions described in the above examples and newly discovered mutations. The  
25 following fully humanized IL-6 receptor antibodies were discovered using various screening tests: Fv3-M73 (H chain, VH4-M73, SEQ ID NO: 182; L chain, VL1-kappa, SEQ ID NO: 183), Fv4-M73 (H chain, VH3-M73, SEQ ID NO: 180; L chain, VL3-kappa, SEQ ID NO: 181), and Fv5-M83 (H chain, VH5-M83, SEQ ID NO: 139; L chain, VL5-kappa, SEQ ID NO: 138).

The affinities of prepared Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 against IL-6 receptor were  
30 compared to that of TOCILIZUMAB (see Reference Example for method). The affinities of these anti-IL-6 receptor antibodies determined are shown in Table 16. Furthermore, their BaF/gp130-neutralizing activities were compared to those of TOCILIZUMAB and the control (the known high affinity anti-IL-6 receptor antibody described in Reference Example, and VQ8F11-21 hIgG1 described in US 2007/0280945; see Reference Example for method). The  
35 results obtained by determining the biological activities of these antibodies using BaF/gp130 are shown in Fig. 44 (TOCILIZUMAB, the control, and Fv5-M83 with a final IL-6 concentration of

300 ng/ml) and Fig. 45 (TOCILIZUMAB, Fv3-M73, and Fv4-M73 with a final IL-6 concentration of 30 ng/ml). As shown in Table 16, Fv3-M73 and Fv4-M73 have about two to three times higher affinity than TOCILIZUMAB, while Fv5-M83 exhibits about 100 times higher affinity than TOCILIZUMAB (since it was difficult to measure the affinity of Fv5-M83, instead the affinity was determined using Fv5-IgG1, which has an IgG1-type constant region; the constant region is generally thought to have no effect on affinity). As shown in Fig. 45, Fv3-M73 and Fv4-M73 exhibit slightly stronger activities than TOCILIZUMAB. As shown in Fig. 44, Fv5-M83 has a very strong activity, which is more than 100 times greater than that of TOCILIZUMAB in terms of 50% inhibitory concentration. Fv5-M83 also exhibits about 10 times higher neutralizing activity in terms of 50% inhibitory concentration than the control (the known high-affinity anti-IL-6 receptor antibody).

Table 16

	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	KD (M)
TOCILIZUMAB	4.0E+05	1.1E-03	2.7E-09
Fv3-M73	8.5E+05	8.7E-04	1.0E-09
Fv4-M73	7.5E+05	1.0E-03	1.4E-09
Fv5-M83	1.1E+06	2.8E-05	2.5E-11

The isoelectric points of TOCILIZUMAB, the control, Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 were determined by isoelectric focusing using a method known to those skilled in the art. The result showed that the isoelectric point was about 9.3 for TOCILIZUMAB; about 8.4 to 8.5 for the control; about 5.7 to 5.8 for Fv3-M73; about 5.6 to 5.7 for Fv4-M73; and 5.4 to 5.5 for Fv5-M83. Thus, each antibody had a significantly lowered isoelectric point when compared to TOCILIZUMAB and the control. Furthermore, the theoretical isoelectric point of the variable regions VH/VL was calculated by GENETYX (GENETYX CORPORATION). The result showed that the theoretical isoelectric point was 9.20 for TOCILIZUMAB; 7.79 for the control; 5.49 for Fv3-M73; 5.01 for Fv4-M73; and 4.27 for Fv5-M83. Thus, each antibody had a significantly lowered isoelectric point when compared to TOCILIZUMAB and the control. Accordingly, the pharmacokinetics of Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 was thought to be improved when compared to TOCILIZUMAB and the control.

T-cell epitopes in the variable region sequence of TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73, or Fv5-M83 were analyzed using TEPITOPE (Methods. 2004 Dec;34(4):468-75). As a result, TOCILIZUMAB was predicted to have T-cell epitopes, of which many could bind to HLA. In contrast, the number of sequences that were predicted to bind to T-cell epitopes was significantly reduced in Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83. In addition, the framework of Fv3-M73, Fv4-M73, or Fv5-M83 has no mouse sequence and is thus fully humanized. These suggest the



possibility that immunogenicity risk is significantly reduced in Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 when compared to TOCILIZUMAB.

[Example 20] PK/PD test of fully humanized anti-IL-6 receptor antibodies in monkeys

5        Each of TOCILIZUMAB, the control, Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 was intravenously administered once at a dose of 1 mg/kg to cynomolgus monkeys to assess the time courses of their plasma concentrations (see Reference Example for method). The plasma concentration time courses of TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 after intravenous administration are shown in Fig. 46. The result showed that each of Fv3-M73, 10 Fv4-M73, and Fv5-M83 exhibited significantly improved plasma retention in cynomolgus monkeys when compared to TOCILIZUMAB and the control. Of them, Fv3-M73 and Fv4-M73 exhibited substantially improved plasma retention when compared to TOCILIZUMAB.

15        The efficacy of each antibody to neutralize membrane-bound cynomolgus monkey IL-6 receptor was assessed. Cynomolgus monkey IL-6 was administered subcutaneously in the lower back at 5 µg/kg every day from Day 6 to Day 18 after antibody administration (Day 3 to Day 10 for TOCILIZUMAB), and the CRP concentration in each animal was determined 24 hours later (see Reference Example for method). The time course of CRP concentration after administration of each antibody is shown in Fig. 47. To assess the efficacy of each antibody to 20 neutralize soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor, the plasma concentration of free soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor in the cynomolgus monkeys was determined and percentage of soluble IL-6 receptor neutralization were calculated (see Reference Example for method). The time course of percentage of soluble IL-6 receptor neutralization after administration of each antibody is shown in Fig. 48.

25        Each of Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 neutralized membrane-bound cynomolgus monkey IL-6 receptor in a more sustainable way, and suppressed the increase of CRP over a longer period when compared to TOCILIZUMAB and the control (the known high-affinity anti-IL-6 receptor antibody). Furthermore, each of Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 neutralized soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor in a more sustainable way, and suppressed 30 the increase of free soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor over a longer period when compared to TOCILIZUMAB and the control. These findings demonstrate that all of Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 are superior in sustaining the neutralization of membrane-bound and soluble IL-6 receptors than TOCILIZUMAB and the control. Of them, Fv3-M73 and Fv4-M73 are remarkably superior in sustaining the neutralization. Meanwhile, Fv5-M83 suppressed CRP 35 and free soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor more strongly than Fv3-M73 and Fv4-M73. Thus, Fv5-M83 is considered to be stronger than Fv3-M73, Fv4-M73, and the control (the

known high-affinity anti-IL-6 receptor antibody) in neutralizing membrane-bound and soluble IL-6 receptors. It was considered that results in *in vivo* of cynomolgus monkeys reflect the stronger affinity of Fv5-M83 for IL-6 receptor and stronger biological activity of Fv5-M83 in the BaF/gp130 assay system relative to the control.

5           These findings suggest that Fv3-M73 and Fv4-M73 are highly superior in sustaining their activities as an anti-IL-6 receptor-neutralizing antibody when compared to TOCILIZUMAB and the control, and thus enable to significantly reduce the dosage and frequency of administration. Furthermore, Fv5-M83 was demonstrated to be remarkably superior in terms of the strength of activity as an anti-IL-6 receptor-neutralizing antibody as well  
10 as sustaining their activity. Thus, Fv3-M73, Fv4-M73, and Fv5-M83 are expected to be useful as pharmaceutical IL-6 antagonists.

[Reference Example]

15   Preparation of soluble recombinant cynomolgus monkey IL-6 receptor (cIL-6R)

          Oligo-DNA primers were prepared based on the disclosed gene sequence for Rhesus monkey IL-6 receptor (Birney *et al.*, Ensembl 2006, Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34 (Database issue):D556-61). A DNA fragment encoding the whole cynomolgus monkey IL-6 receptor gene was prepared by PCR using the primers, and as a template, cDNA prepared from the  
20 pancreas of cynomolgus monkey. The resulting DNA fragment was inserted into an animal cell expression vector, and a stable expression CHO line (cyno.sIL-6R-producing CHO cell line) was prepared using the vector. The culture medium of cyno.sIL-6R-producing CHO cells was purified using a HisTrap column (GE Healthcare Bioscience) and then concentrated with Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore). A final purified sample of soluble cynomolgus  
25 monkey IL-6 receptor (hereinafter cIL-6R) was obtained through further purification on a Superdex200pg16/60 gel filtration column (GE Healthcare Bioscience).

Preparation of recombinant cynomolgus monkey IL-6 (cIL-6)

          Cynomolgus monkey IL-6 was prepared by the procedure described below. The  
30 nucleotide sequence encoding 212 amino acids deposited under SWISSPROT Accession No. P79341 was prepared and cloned into an animal cell expression vector. The resulting vector was introduced into CHO cells to prepare a stable expression cell line (cyno.IL-6-producing CHO cell line). The culture medium of cyno.IL-6-producing CHO cells was purified using a SP-Sepharose/FF column (GE Healthcare Bioscience) and then concentrated with Amicon  
35 Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore). A final purified sample of cynomolgus monkey IL-6 (hereinafter cIL-6) was obtained through further purification on a Superdex75pg26/60 gel

filtration column (GE Healthcare Bioscience), followed by concentration with Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore).

#### Preparation of a known high-affinity anti-IL-6 receptor antibody

5 An animal cell expression vector was constructed to express VQ8F11-21 hIgG1, a known high-affinity anti-IL-6 receptor antibody. VQ8F11-21 hIgG1 is described in US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1; the amino acid sequences of H chain and L chain as set forth in SEQ ID NOs: 19 and 27, respectively). The antibody variable region was constructed by PCR using a combination of synthetic oligo DNAs (assembly PCR). IgG1 was  
10 used as the constant region. The antibody variable and constant regions were combined together by assembly PCR, and then inserted into an animal cell expression vector to construct expression vectors for the H chain and L chain of interest. The nucleotide sequences of the resulting expression vectors were determined by a method known to those skilled in the art. The high-affinity anti-IL-6 receptor antibody (hereinafter abbreviated as “control”) was  
15 expressed and purified using the constructed expression vectors by the method described in Example 1.

#### Biacore-based analysis of binding to IL-6 receptor

Antigen-antibody reaction kinetics was analyzed using Biacore T100 (GE Healthcare).  
20 The SR344-antibody interaction was measured by immobilizing appropriate amounts of anti-IgG ( $\gamma$ -chain specific) F(ab')<sub>2</sub> onto a sensor chip by amine coupling method, binding antibodies of interest onto the chip at pH7.4, and then running IL-6 receptor SR344 adjusted to be various concentrations at pH7.4 over the chip as an analyte. All measurements were carried out at 37°C. The kinetic parameters, association rate constant  $k_a$  (1/Ms) and dissociation rate constant  $k_d$  (1/s)  
25 were calculated from the sensorgrams obtained by measurement. Then,  $K_D$  (M) was determined based on the rate constants. The respective parameters were determined using Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare).

#### PK/PD test to determine the plasma concentrations of antibodies, CRP, and free soluble IL-6 receptor in monkeys

30

The plasma concentrations in cynomolgus monkeys were determined by ELISA using a method known to those skilled in the art.

The concentration of CRP was determined with an automated analyzer (TBA-120FR; Toshiba Medical Systems Co.) using Cias R CRP (KANTO CHEMICAL CO., INC.).

35 The plasma concentration of free soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor in cynomolgus monkeys was determined by the procedure described below. All IgG antibodies

(cynomolgus monkey IgG, anti-human IL-6 receptor antibody, and anti-human IL-6 receptor antibody-soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor complex) in the plasma were adsorbed onto Protein A by loading 30  $\mu$ l of cynomolgus monkey plasma onto an appropriate amount of rProtein A Sepharose Fast Flow resin (GE Healthcare) dried in a 0.22- $\mu$ m filter cup (Millipore).

5 Then, the solution in cup was spinned down using a high-speed centrifuge to collect the solution that passed through. The solution that passed through does not contain Protein A-bound anti-human IL-6 receptor antibody-soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor complex.

Therefore, the concentration of free soluble IL-6 receptor can be determined by measuring the concentration of soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor in the solution that passed through

10 Protein A. The concentration of soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor was determined using a method known to those skilled in the art for measuring the concentrations of soluble human IL-6 receptor. Soluble cynomolgus monkey IL-6 receptor (cIL-6R) prepared as described above was used as a standard.

15 Then the percentage of soluble IL-6 receptor neutralization was calculated by following formula.

$$\frac{\text{Free soluble IL-6 receptor concentration after antibody administration}}{\text{Soluble IL-6 receptor concentration before antibody administration}} \times 100$$

#### Industrial Applicability

20 The present invention provides second-generation molecules, which are more superior than the humanized anti-IL-6 receptor IgG1 antibody TOCILIZUMAB, and have been improved to exhibit enhanced antigen-neutralizing activity and pharmacokinetics, and thus produce a prolonged therapeutic effect even when the frequency of administration is reduced. They have also been improved to have reduced immunogenicity, and improved safety and physiochemical properties, by altering amino acid sequences of the variable and constant regions of

25 TOCILIZUMAB. Furthermore, the present invention also provides antibody constant regions suitable for pharmaceuticals.



## CLAIMS

1. An anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

- 5 (a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino acid;
- (b) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Trp at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino acid;
- 10 (c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Tyr at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;
- (d) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;
- 15 (e) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;
- 20 (f) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;
- (g) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Leu at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;
- 25 (h) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;
- (i) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Ala at position 7 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;
- 30 (j) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 has been substituted with another amino acid;
- 35 (k) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Ser at

position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;

(l) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR3 in which Leu at position 2, Ala at position 7, and Met at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;

(m) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

(n) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Gln at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

(o) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

(p) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Asn at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

(q) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid;

(r) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Gln at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;

(s) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;

(t) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Tyr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid, and CDR3 in which Gly at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;

(u) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;

(v) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Gln at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 have been substituted with other amino acids;

(w) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid, and CDR3 in which Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;

5 (x) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (k) and the light chain variable region of (v); and

(y) the antibody of (x) that further comprises the CDR2 of (e).

10 2. An anti-IL-6 receptor antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid.

3. An anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

15 (a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 13 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid;

(b) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Gln at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid;

20 (c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Thr at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid;

25 (d) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 has been substituted with another amino acid;

(e) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 13, Gln at position 16, Thr at position 23, and Thr at position 30 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7 have been substituted with other amino acids;

30 (f) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR2 in which Arg at position 8 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 has been substituted with another amino acid;

(g) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Met at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino

acid;

(h) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Leu at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid;

5 (i) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Arg at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid;

10 (j) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Val at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 has been substituted with another amino acid;

(k) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 in which Met at position 4, Leu at position 5, Arg at position 16, and Val at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 have been substituted with other amino acids;

15 (l) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Gln at position 3 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 has been substituted with another amino acid;

(m) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR1 in which Arg at position 18 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 has been substituted with another amino acid;

20 (n) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR2 in which Lys at position 11 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 has been substituted with another amino acid;

25 (o) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Gln at position 23 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with another amino acid;

(p) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Pro at position 24 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with another amino acid;

30 (q) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 has been substituted with another amino acid;

(r) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR3 in which Gln at position 23, Pro at position 24, and Ile at position 27 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 have been substituted with other amino acids;

35 (s) an antibody that comprises a light chain variable region comprising FR4 in which Lys at position 10 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 has been substituted with another



amino acid;

(t) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 has been substituted with another amino acid;

5 (u) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR4 in which Gln at position 3 and Ser at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 have been substituted with other amino acids;

(v) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising FR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 184;

10 (w) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the FR1 of (e), FR2 of (f), FR3 of (k), and FR4 of (l) or (u);

(x) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the FR1 of (m), FR2 of (n), FR3 of (r), and FR4 of (s); and

15 (y) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (w) and the light chain variable region of (x).

4. An anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

20 (a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has been substituted with another amino acid;

(b) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;

25 (c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 has been substituted with another amino acid;

(d) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 9 and Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 have been substituted with other amino acids;

30 (e) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid;

35 (f) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 2 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid;

- (g) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 has been substituted with another amino acid;
- (h) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR2 in which Thr at position 2 and Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 have been substituted with other amino acids;
- (i) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR3 in which Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 has been substituted with another amino acid;
- (j) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the CDR1 of (a), CDR2 of (d), and CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3;
- (k) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the CDR1 of (e), CDR2 of (h), and CDR3 of (i); and
- (l) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (j) and the light chain variable region of (k).

5. An anti-IL-6 receptor antibody of any one of:

- (a) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising CDR1 in which Ser at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 has been substituted with another amino acid, CDR2 in which Thr at position 9 and Ser at position 16 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 have been substituted with other amino acids, and CDR3 in which Ser at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 have been substituted with other amino acids;
- (b) an antibody that comprises a light chain variable region comprising CDR1 in which Arg at position 1 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 has been substituted with another amino acid, CDR2 in which Thr at position 2 and Arg at position 4 in the amino acid sequence of SEQ ID NO:5 have been substituted with other amino acids, and CDR3 in which Gln at position 1 and Thr at position 5 in the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 have been substituted with other amino acids;
- (c) an antibody that comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 22;
- (d) an antibody that comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23;
- (e) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (a) and the light chain variable region of (b); and

(f) an antibody that comprises the heavy chain variable region of (c) and the light chain variable region of (d).

6. An anti-IL-6 receptor antibody whose binding activity to an IL-6 receptor is 1 nM or less.

5

7. An anti-IL-6 receptor antibody, wherein the measured isoelectric point of the full-length antibody is 7.0 or lower or the theoretical isoelectric point of the variable region is 5.0 or lower.

10 8. An anti-IL-6 receptor antibody, wherein the increase in the ratio of antibody aggregate after one month at 25°C in a buffer containing 20 mM Histidine-HCl and 150 mM NaCl at pH 6.5 to 7.0 is 0.3% or less when the concentration of the antibody is 100 mg/ml.

9. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 6 to 8.

## ABSTRACT

5       The present inventors succeeded in discovering specific amino acid mutations in the variable region, framework region, and constant region of TOCILIZUMAB, and this enables to reduce immunogenicity risk and the heterogeneity originated from disulfide bonds in the hinge region, as well as to improve antigen binding activity, pharmacokinetics, stability under acidic conditions, and stability in high concentration preparations.



(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

PCT

(43) 国際公開日  
2009 年 4 月 2 日 (02.04.2009)(10) 国際公開番号  
WO 2009/041621 A1(51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/067499

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2008 年 9 月 26 日 (26.09.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2007-250165 2007 年 9 月 26 日 (26.09.2007) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井川 智之 (IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 櫻井 実香 (SAKURAI, Mika) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 小嶋 哲郎 (KOJIMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 橘 達彦 (TACHIBANA, Tatsuhiko) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 白岩 宙文 (SHIRAIWA, Hirotake) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 角田 浩行 (TSUNODA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒4128513

規則4.17に規定する申立て:

— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))

添付公開書類:

— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: ANTI-IL-6 RECEPTOR ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗IL-6レセプター抗体

(57) Abstract: In the variable region, framework region and constant region of TOCILIZUMAB, a specific amino acid mutation, which potentiates an antigen-binding ability, elevates drug kinetics, lowers an immunogenic risk, elevates the stability under acidic conditions, improves heterogeneity due to a disulfide in the hinge region, improves the stability of a high-concentration preparation and so on, has been successfully found out.

(57) 要約: 本発明者らは、TOCILIZUMABの可変領域、フレームワーク領域、及び定常領域において、抗原への結合能、薬物動態の向上、免疫原性リスクの低下、酸性条件下での安定性の向上、ヒンジ領域のジスルフィドに由来するヘテロジェニティーの改善、高濃度製剤における安定性を改善などをもち、特定のアミノ酸変異を見出すことに成功した。

WO 2009/041621 A1

## 明 細 書

### 抗IL-6レセプター抗体

### 技術分野

- [0001] 本発明は、抗IL-6レセプター抗体を有効成分として含有する医薬組成物、および、その製造法等に関する。

### 背景技術

- [0002] 抗体は血漿中(血中)での安定性が高く、副作用も少ないことから医薬品として注目されている。中でもIgG型の抗体医薬は多数上市されており、現在も数多くの抗体医薬が開発されている(非特許文献1、非特許文献2)。

IL-6は様々な自己免疫疾患に関与するサイトカインであり(非特許文献3)、ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABはIL-6レセプターに特異的に結合し、その生物学的作用を中和することで、関節リウマチ等のIL-6が関連する疾患の治療薬として利用可能であると考えられている(特許文献1、2、3、非特許文献4)。実際、TOCILIZUMABはすでにキャスルマン病の治療薬として日本で承認されている(非特許文献5)。

- [0003] 第2世代の抗体医薬に適用可能な技術として様々な技術が開発されており、エフェクター機能、抗原結合能、血漿中滞留性(血中滞留性)、安定性を増強させる、あるいは、免疫原性(抗原性)リスクを低減させる技術等が報告されている。

薬効を増強させる、あるいは、投与量を低減させる方法として、IgG抗体のFc領域のアミノ酸置換により抗体依存性細胞障害活性(ADCC活性)や補体依存性細胞障害活性(CDC活性)を増強させる技術が報告されている(非特許文献6)。また、抗原結合能、抗原中和能を増強させる技術として、アフィニティマチュレーション技術(非特許文献7)が報告されており、可変領域のCDR領域などのアミノ酸に変異を導入することで抗原への結合活性を増強することが可能である。抗原結合能の増強によりin vitroの生物活性を向上させる、あるいは投与量を低減することが可能であり、さらにin vivoでの薬効を向上させることも可能である(非特許文献8)。現在、抗RSV抗体の第一世代薬であるPalivizumabより優れた効果を発揮するとされるMotavizumab (affinity

maturationにより作製)の臨床試験が行われている(非特許文献9)。また異なるエピトープに結合することでより優れた効果を出すことも可能である。例えば抗CD20抗体であるRituximabとは異なるエピトープを認識するOftamumabはin vivoでRituximabより優れた効果を発揮することが報告されており、現在臨床試験が行われている(非特許文献10)。抗IL-6レセプター抗体においては、これまでに1nMより強いアフィニティを有するヒト抗体あるいはヒト化抗体あるいはキメラ抗体の報告は無い。

現在の抗体医薬が抱える問題として、投与タンパク量が非常に大きいことによる高い製造コストが挙げられる。ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABにおいても投与量は8mg/kg/month程度の静脈内注射が想定されている(非特許文献4)。また投与形態については、慢性的な自己免疫疾患の場合は皮下投与製剤が望ましいとされている。一般的に皮下投与製剤は高濃度製剤であることが必要であり、IgGタイプの抗体製剤の場合、安定性等の点から一般的には100mg/mL程度の製剤が限度であると考えられる(非特許文献11)。持続的な治療効果を発揮できるように抗体の血漿中半減期を長くすることで投与タンパク量を小さくし、高濃度製剤が可能な程度に高い安定性を付与することによって、長い投与間隔での皮下投与を可能にし、低コスト且つ利便性の高い第2世代の抗体医薬を提供することが可能である。

抗体の血漿中半減期を向上させる方法として、定常領域の人工的なアミノ酸置換が報告されている(非特許文献12、13)が、免疫原性リスクの観点から定常領域に天然に存在しない配列を導入することは好ましくない。また、免疫原性の観点からは定常領域よりも可変領域にアミノ酸置換を行うほうが望ましいが、これまでに可変領域のアミノ酸置換により抗体の血漿中半減期を向上させた報告は無く、ヒト、あるいは、ヒト化、あるいは、キメラIL-6レセプター抗体において血漿中半減期を向上させた報告は無い。

安定性を改善する方法として、可変領域のフレームワークのアミノ酸置換やシャッフリングによる物理化学的安定性(熱変性中間温度)の向上(非特許文献14、15)が報告されているが、これまでにこれらのアミノ酸置換により100mg/mLを越える高濃度製剤において安定性を改善した(会合体生成を抑制した)報告はなく、ヒト、あるいは、ヒト化IL-6レセプター抗体においても100mg/mLを越える高濃度製剤において安定な

抗体分子に関する報告は無い。

- [0004] バイオ医薬品を開発するにあたってもうひとつの重要な問題は免疫原性である。一般的にマウス抗体はヒト化することによって免疫原性が低減される。ヒト化する際のテンプレートフレームワークにジャームライン配列を用いることにより、免疫原性のリスクはさらに軽減できるとされている(非特許文献16)。しかしながら、完全ヒト抗TNF抗体であるAdalimumabであっても13～17%と高頻度で免疫原性が出現し、免疫原性が出現した患者においては治療効果の低減が見られている(非特許文献17、18)。ヒト抗体であってもCDR領域にT-cell epitopeが存在する可能性があり、CDR上のT-cell epitopeが免疫原性の原因となっている可能性がある。T-cellエピトープをin silicoあるいはin vivoで予測する方法が報告されているが(非特許文献19、20)、これらの方法を用いて予測されるT-cellエピトープを除去することで、免疫原性リスクを低減することが可能であると考えられる(非特許文献21)。ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABは、マウスPM1抗体をヒト化したIgG1抗体である。H鎖、L鎖それぞれNEW、REIのヒト配列をテンプレートフレームワークとして用いてCDRグラフトイングを行っているが、活性保持に重要なアミノ酸として5アミノ酸がマウス配列としてフレームワークに残存している(非特許文献22)。これまでヒト化抗体であるTOCILIZUMABのフレームワークに残存するマウス配列を活性を低下させることなくヒト配列に置換した報告は無い。また、TOCILIZUMABのCDR配列はマウス配列であり、Adalimumab同様CDR領域にT-cell epitopeが存在する可能性があり、免疫原性のリスクは否定できない。さらにTOCILIZUMABはIgG1サブクラスであることから、Fc $\gamma$ レセプターに結合可能である。Fc $\gamma$ レセプターは抗原提示細胞に発現していることから、Fc $\gamma$ レセプターに結合する分子は抗原提示されやすくなり、IgG1のFc部分にタンパク質やペプチドを結合することによって免疫原性が増強する(させることが可能である)ことが報告されている(非特許文献23、特許文献4)。TOCILIZUMABの臨床試験において、薬効用量である8mg/kgにおいて抗TOCILIZUMAB抗体の出現は認められていないが、4mg/kgおよび2mg/kgにおいては免疫原性が認められている(特許文献5)。これらのことから、ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABの免疫原性については改善の余地があると考えられる。しかしながら、これまでにアミノ酸置換によ



り免疫原性リスクを改善させたTOCILIZUMAB(ヒト化PM-1抗体)に関する報告は無い。

[0005] また近年、抗体医薬の安全性が非常に重要視されている。TGN1412のPhase I臨床試験で見られた重大な副作用の原因の一つとして、抗体のFc部分とFc $\gamma$ レセプターの相互作用が考えられている(非特許文献24)。抗原の生物学的作用を中和することが目的の抗体医薬においてはFc領域のADCC等のエフェクター機能に重要なFc $\gamma$ レセプターへの結合は不必要である。また、上述の通り、免疫原性や副作用の点から考えると、Fc $\gamma$ レセプターへの結合は好ましくない可能性も考えられる。

[0006] Fc $\gamma$ レセプターへの結合を完全に無くすことは出来ないが低下させる方法としては、IgG抗体のアイソタイプをIgG1からIgG2あるいはIgG4に変える方法が考えられる(非特許文献25)。Fc $\gamma$ レセプターへの結合を完全に無くす方法としては、人工的な改変をFc領域に導入する方法が報告されている。例えば、抗CD3抗体や抗CD4抗体は抗体のエフェクター機能が副作用を惹起する。そこで、Fc領域のFc $\gamma$ レセプター結合部分に野生型配列には存在しないアミノ酸変異(非特許文献26、27)を導入したFc $\gamma$ レセプター非結合型の抗CD3抗体や抗CD4抗体の臨床試験が現在行われている(非特許文献24、28)。また、IgG1のFc $\gamma$ R結合部位(EUナンバリング:233、234、235、236、327、330、331番目)をIgG2およびIgG4の配列にすることでFc $\gamma$ レセプター非結合型抗体を作製することが可能である(非特許文献29、特許文献6)。しかしながら、これらの分子はいずれも天然には存在しないT-cellエピトープペプチドとなりうる9～12アミノ酸の新しいペプチド配列が出現しており、免疫原性のリスクが考えられる。このような課題を解決したFc $\gamma$ レセプター非結合型抗体の報告はこれまでにない。

[0007] 一方、抗体を医薬品として開発するにあたり、そのタンパク質の物性、中でも均一性と安定性は極めて重要である。IgG2のアイソタイプは、ヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーが報告されている(非特許文献30)。これに由来する目的物質/関連物質のヘテロジェニティーの製造間差を維持しつつ医薬品として大量に製造することは難しい。医薬品として開発する抗体分子は、可能な限り単一物質であることが望まれる。

また、IgG2およびIgG4は酸性条件下での安定性に乏しい。一般にIgGタイプの抗体はプロテインAを用いた精製工程およびウィルス不活性化工程において酸性条件下に暴露されることから、IgG2およびIgG4は同工程においては会合化・変性する可能性がある。そのため医薬品として開発する抗体分子は望ましくは酸性条件下においても安定であったほうがよい。天然型のIgG2およびIgG4、および、IgG2およびIgG4をベースにしたFc $\gamma$ レセプター非結合型抗体(非特許文献25、26、特許文献6)においては、これらの課題があり、医薬品として開発する上では解決されることが望まれる。

IgG1タイプの抗体は酸性条件下で比較的安定であり、ヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーも少ないが、製剤保存中にヒンジ領域のペプチド結合が非酵素的に溶液中で分解が進行し、不純物としてFab断片が生成することが報告されている(非特許文献31)。医薬品として開発するには不純物の生成は解決されることが望ましい。

また、抗体のC末端配列のヘテロジェニティーとして、C末端アミノ酸のLys残基の欠損、および、C末端の2アミノ酸のGly、Lysの欠損によるC末端アミノ基のアミド化が報告されており(非特許文献32)、医薬品として開発する上にはこれらのヘテロジェニティーは存在しないことが望ましい。

このように抗原を中和することが目的の抗体医薬の定常領域は、これらの課題を全て解決した定常領域配列が望ましいが、これらの条件を全て満たす定常領域の報告はこれまでにない。

[0008] これまでに、第1世代の分子と比較して抗原中和能を増強させつつ、投与頻度を少なくし持続的に治療効果を発揮し、且つ、免疫原性、安全性、物性を改善させた第2世代の分子の開発は報告されていない。また、ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABの可変領域および定常領域のアミノ酸配列を改変することで、上述した項目においてより優れた第2世代のTOCILIZUMABに関する報告もない。

[0009] なお、本発明の先行技術文献を以下に示す。

非特許文献1: Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073 - 1078 (2005)

非特許文献2:Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. 2005 Apr;59(3):389-96.

非特許文献3:Nishimoto N, Kishimoto T., Interleukin 6: from bench to bedside., Nat Clin Pract Rheumatol. 2006 Nov;2(11):619-26.

非特許文献4:Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Broll J, Balint G, Emery P, Raemen F, Petersen J, Smolen J, Thomson D, Kishimoto T; CHARISMA Study Group., Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, Tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate., Arthritis Rheum. 2006 Sep;54(9):2817-29

非特許文献5:Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. Blood. 2005 Oct 15;106(8):2627-32.

非特許文献6:Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review.

非特許文献7:Rothe A, Hosse RJ, Power BE. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. Expert Opin Biol Ther. 2006 Feb;6(2):177-87.

非特許文献8:Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8466-71. Epub 2005 Jun 6. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries.Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R.

非特許文献9:Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. J Mol Biol. 2007, 368, 652-665

非特許文献10:Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Slootstra JW, Parren PW, Glennie M

J, van de Winkel JG. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):362-71

非特許文献11:Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J Pharm Sci.* 2004 Jun;93(6):1390-402.

非特許文献12:Hinton PR, Xiong JM, Johlf s MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):346-56

非特許文献13:Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., *Nat Biotechnol.* 1997 Jul;15(7):637-40

非特許文献14:Ewert S, Honegger A, Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering., *Methods.* 2004 Oct;34(2):184-99.

Review

非特許文献15:Damschroder MM, Widjaja L, Gill PS, Krasnoperov V, Jiang W, Dall'Acqua WF, Wu H., Framework shuffling of antibodies to reduce immunogenicity and manipulate functional and biophysical properties.*Mol Immunol.* 2007 Apr;44(11):3049-60

非特許文献16:Hwang WY, Almagro JC, Buss TN, Tan P, Foote J. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization.*Methods.* 2005 May;36(1):35-42

非特許文献17:Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak P, Wolbink GJ. Clinical response to adalimumab: The relationship with anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* Jul;66(7):921-6 Epub 2007 Feb 14

非特許文献18:Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int.* 2007 Jan;27(3):269-74.



非特許文献19:Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, Stas P, Lasters I. Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 Mar;7(3):405-18.

非特許文献20:Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP. Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2005 May;3(5):991-1000.

非特許文献21:Chirino AJ, Ary ML, Marshall SA. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov Today*. 2004 Jan 15;9(2):82-90.

非特許文献22:Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res*. 1993 Feb 15;53(4):851-6.

非特許文献23:Guyre PM, Graziano RF, Goldstein J, Wallace PK, Morganelli PM, Wardwell K, Howell AL. Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens. *Cancer Immunol Immunother*. 1997 Nov-Dec;45(3-4):146-8.

非特許文献24:Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jan;6(1):75-92.

非特許文献25:Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol*. 1998 Jun;76(6):231-48.

非特許文献26:Cole MS, Anasetti C, Tso JY. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J Immunol*. 1997 Oct 1;159(7):3613-21.

非特許文献27:Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, Dal Monte PR, Doyle ML, Brigham-Burke MR, Anderson D, Reff M, Newman R, Hanna N, Sweet RW, Truneh A. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):1925-33.

非特許文献28:Chau LA, Tso JY, Melrose J, Madrenas J. HuM291(Nuvion), a humanized Fc receptor-nonbinding antibody against CD3, anergizes peripheral blood T c

ells as partial agonist of the T cell receptor. Transplantation. 2001 Apr 15;71(7):941-50.

非特許文献29: Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM., Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24.

非特許文献30: Chu GC, Chelius D, Xiao G, Khor HK, Coulibaly S, Bondarenko PV. Accumulation of Succinimide in a Recombinant Monoclonal Antibody in Mildly Acidic Buffers Under Elevated Temperatures. Pharm Res. 2007 Mar 24;24(6):1145-56

非特許文献31: A.J. Cordoba, B.J. Shyong, D. Breen, R.J. Harris, Nonenzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution, J. Chromatogr., B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 818 (2005) 115-121.

非特許文献32: Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. Anal Biochem. 2007 Jan 1;360(1):75-83.

特許文献1: WO 92/19759

特許文献2: WO 96/11020

特許文献3: WO 96/12503

特許文献4: US 20050261229A1

特許文献5: WO 2004096273(A1)

特許文献6: WO 99/58572

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は、ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABの可変領域および定常領域のアミノ酸配列を改変することで、抗原中和能を増強させつつ、薬物動態を向上(血漿中滞留性を向上)させることで投与頻度を少なくし持続的に治療効果を発揮し、且つ、免疫原性、安全性、物性を改善させ、TOCILIZUMABより優れた第2世代の分子からなる医薬組成物、並びに、それらの医薬組成物の製造方法を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、第1世代のヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABの可変領域および定常領域のアミノ酸配列を改変することで、薬効を増強させつつ、薬物動態を向上させることで投与頻度を少なくし持続的に治療効果を発揮し、且つ、免疫原性、安全性、物性(安定性および均一性)を改善させ、TOCILIZUMABより優れた第2世代の分子の創製に向けて、鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、TOCILIZUMABの可変領域において、抗原への結合能(アフィニティー)を向上させるCDR変異を複数見出しその組み合わせにより大幅にアフィニティーを向上させることに成功した。また本発明者らは、可変領域配列の等電点を低下させる改変を導入することで薬物動態を向上させることに成功した。また本発明者らは、TOCILIZUMABのフレームワークに残存するマウス由来の配列および可変領域においてin silicoで予測されたT-cellエピトープペプチドの数を低減させ免疫原性リスクを低減させることに成功した。また、同時に高濃度における安定性を向上させることにも成功した。さらに本発明者らは、TOCILIZUMABの定常領域において、新しいT-cellエピトープペプチドの出現を最小限にしつつ、Fc $\gamma$ レセプターに結合を示さず、酸性条件下での安定性、ヒンジ領域のジスルフィドに由来するヘテロジェニティー、H鎖C末端に由来するヘテロジェニティー、高濃度製剤における安定性を改善させた新規な定常領域配列を見出すことに成功した。これらCDR領域アミノ酸配列の改変、可変領域アミノ酸配列の改変、定常領域アミノ酸配列の改変を組み合わせることでTOCILIZUMABより優れた第2世代の分子の創製に成功した。

[0012] 本発明は、ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABの可変領域および定常領域のアミノ酸配列の改変により、より優れた抗原(IL-6レセプター)への結合能を有し、より優れた血漿中滞留性を有し、より優れた安全性・免疫原性リスク・物性(安定性、均一性)を有するヒト化抗IL-6レセプターIgG抗体からなる医薬組成物、並びに、それらの医薬組成物の製造方法に関する。より具体的には、下記〔1〕～〔41〕を提供するものである。

〔1〕以下の(a)～(y)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；

(a) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換さ

れているCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(b) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列において5番目のTrpが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(c) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において1番目のTyrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(d) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において8番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(e) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(f) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(g) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列において2番目のLeuが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(h) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列において5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(i) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列において7番目のAlaが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(j) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列において8番目のMetが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(k) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(l) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列において2番目のLeu、7番目のAlaおよび8番目のMetが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(m) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(n) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において4番目のGlnが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(o) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において9番目のTyrが他のアミノ酸に置換さ



れているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(p) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において11番目のAsnが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(q) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(r) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(s) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において3番目のGlyが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(t) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において9番目のTyrが他のアミノ酸に置換されているCDR1及び配列番号:6に記載のアミノ酸配列において3番目のGlyが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(u) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(v) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(w) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2、および配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(x) (k)に記載の重鎖可変領域および(v)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体、又は

(y) (e)のCDR2をさらに含む(x)に記載の抗体、

[2]配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗IL-6レセプター抗体、

[3]以下の(a)～(y)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；

(a) 配列番号:7に記載のアミノ酸配列において13番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(b) 配列番号:7に記載のアミノ酸配列において16番目のGlnが他のアミノ酸に置換さ

れたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(c) 配列番号:7に記載のアミノ酸配列において23番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(d) 配列番号:7に記載のアミノ酸配列において30番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(e) 配列番号:7に記載のアミノ酸配列において13番目のArg、16番目のGln、23番目のThrおよび30番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(f) 配列番号:8に記載のアミノ酸配列において8番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(g) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列において4番目のMetが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(h) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列において5番目のLeuが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(i) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列において16番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(j) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列において27番目のValが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(k) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列において4番目のMet、5番目のLeu、16番目のArgおよび27番目のValが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(l) 配列番号:10に記載のアミノ酸配列において3番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(m) 配列番号:11に記載のアミノ酸配列において18番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(n) 配列番号:12に記載のアミノ酸配列において11番目のLysが他のアミノ酸に置換されたFR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(o) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において23番目のGlnが他のアミノ酸に置換

されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(p) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において24番目のProが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(q) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において27番目のIleが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(r) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において23番目のGln、24番目のProおよび27番目のIleが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(s) 配列番号:14に記載のアミノ酸配列において10番目のLysが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(t) 配列番号:10に記載のアミノ酸配列において5番目のSerが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(u) 配列番号:10に記載のアミノ酸配列において3番目のGlnおよび5番目のSerが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(v) 配列番号:184に記載のアミノ酸配列を有するFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(w) (e)に記載のFR1、(f)に記載のFR2、(k)に記載のFR3および(l)または(u)に記載のFR4を含む重鎖可変領域を含む抗体、

(x) (m)に記載のFR1、(n)に記載のFR2、(r)に記載のFR3および(s)に記載のFR4を含む軽鎖可変領域を含む抗体、又は

(y) (w)に記載の重鎖可変領域、および、(x)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体、

[4]以下の(a)～(l)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；

(a) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(b) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(c) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(d) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrおよび16番目のSerが他

のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(e) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(f) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(g) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(h) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrおよび4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(i) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において5番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(j) (a)に記載のCDR1、(d)に記載のCDR2および配列番号:3に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗体、

(k) (e)に記載のCDR1、(h)に記載のCDR2および(i)に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体、又は

(l) (j)に記載の重鎖可変領域、および、(k)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体、

[5]以下の(a)～(f)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；

(a) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸配列に置換されたCDR1、配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrおよび16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2、および配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗体、

(b) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR1、配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrおよび4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2、および配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

(c) 配列番号:22に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、



(d) 配列番号:23に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(e) (a)に記載の重鎖可変領域および(b)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体、

又は

(f) (c)に記載の重鎖可変領域および(d)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体、

[6]以下の(a)～(c)いずれかに記載のヒト抗体定常領域;

(a) 配列番号:19に記載のアミノ酸配列において、329番目(EUナンバリング446番目)のGlyと330番目(EUナンバリング447番目)のLysが両方欠損していることを特徴とする、ヒト抗体定常領域、

(b) 配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、325番目(EUナンバリング446番目)のGlyと326番目(EUナンバリング447番目)のLysが両方欠損していることを特徴とする、ヒト抗体定常領域、

(c) 配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、326番目(EUナンバリング446番目)のGlyと327番目(EUナンバリング447番目)のLysが両方欠損していることを特徴とする、ヒト抗体定常領域、

[7]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、209番目(EUナンバリング330番目)、210番目(EUナンバリング331番目)および218番目(EUナンバリング339番目)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域、

[8]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、276番目(EUナンバリング397番目)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域、

[9]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、14番目(EUナンバリング131番目)、102番目(EUナンバリング219番目)、および／または16番目(EUナンバリング133番目)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域、

[10]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、20番目(EUナンバリング137番目)および21番目(EUナンバリング138番目)のアミノ酸がさらに他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする、[9]に記載のIgG2定常領域、

[11]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、147番目(EUナンバリングの268番目)のHis、234番目(EUナンバリングの355番目)のArgおよび／または298番目(EUナンバリングの419番目)のGlnが他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域、

[12]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、209番目(EUナンバリング330番目)、210番目(EUナンバリング331番目)、218番目(EUナンバリング339番目)、276番目(EUナンバリング397番目)、14番目(EUナンバリング131番目)、16番目(EUナンバリング133番目)、102番目(EUナンバリング219番目)、20番目(EUナンバリング137番目)および21番目(EUナンバリング138番目)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[13][12]に記載のIgG2定常領域において、さらに325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[14]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、276番目(EUナンバリング397番目)、14番目(EUナンバリング131番目)、16番目(EUナンバリング133番目)、102番目(EUナンバリング219番目)、20番目(EUナンバリング137番目)および21番目(EUナンバリング138番目)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[15][14]に記載のIgG2定常領域において、さらに325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[16]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング219番目)のCys、20番目の(EUナンバリング137番目)のGlu、21番目(EUナンバリング138番目)のSer、147番目(EUナンバリング268番目)のHis、234番目(EUナンバリング355番目)のArgおよび298番目(EUナンバリング419番目)のGlnが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[17][16]に記載のIgG2定常領域において、さらに325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[18]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング21

9番目)のCys、20番目の(EUナンバリング137番目)のGlu、21番目(EUナンバリング138番目)のSer、147番目(EUナンバリング268番目)のHis、234番目(EUナンバリング355番目)のArg、298番目(EUナンバリング419番目)のGln、および313番目(EUナンバリング434番目)のAsnが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[19][18]に記載のIgG2定常領域において、さらに325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[20]配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、289番目(EUナンバリング409番目)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とするIgG4定常領域、

[21]配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、289番目(EUナンバリング409番目)、14番目、16番目、20番目、21番目、97番目、100番目、102番目、103番目、104番目および105番目(EUナンバリング131,133,137,138,214,217,219,220,221,222番目)、113番目、114番目および115番目(EUナンバリング233,234,235番目)のアミノ酸が他のアミノ酸に置換され、かつ116番目(EUナンバリング236番目)のアミノ酸が欠損したアミノ酸配列を有するIgG4定常領域、

[22][21]に記載のIgG4定常領域において、さらに326番目(EUナンバリング446番目)のGlyと327番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠失したIgG4定常領域、

[23]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、209番目(EUナンバリングの330番目)のAla、210番目(EUナンバリングの331番目)のPro、218番目(EUナンバリングの339番目)のThr、14番目(EUナンバリングの131番目)のCys、16番目(EUナンバリングの133番目)のArg、102番目(EUナンバリングの219番目)のCys、20番目(EUナンバリングの137番目)のGlu、21番目(EUナンバリングの138番目)のSerが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[24][23]に記載のIgG2定常領域において、さらに325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[25]配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、14番目(EUナンバリング131)

のCys、16番目(EUナンバリング133)のArg、102番目(EUナンバリング219)のCys、20番目(EUナンバリング137)のGlu、21番目の(EUナンバリング138)のSerが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[26][25]に記載のIgG2定常領域において、さらに325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域、

[27]配列番号:24に記載のアミノ酸配列を有する定常領域、

[28]配列番号:118に記載のアミノ酸配列を有する定常領域、

[29]配列番号:25に記載のアミノ酸配列を有する定常領域、

[30]配列番号:151に記載のアミノ酸配列を有する定常領域、

[31]配列番号:152に記載のアミノ酸配列を有する定常領域、

[32]配列番号:153に記載のアミノ酸配列を有する定常領域、

[33]配列番号:164に記載のアミノ酸配列を有する定常領域、

[34]配列番号:194(M40 Δ GK)に記載のアミノ酸配列を有するヒト抗体定常領域、

[35]配列番号:192(M86 Δ GK)に記載のアミノ酸配列を有するヒト抗体定常領域、

[36][6]～[35]のいずれかに記載の定常領域を有する抗体、

[37]IL-6レセプターに結合することを特徴とする、[36]に記載の抗体、

[38]IL-6レセプターへの結合活性が1nM以下である抗ヒトIL-6受容体抗体、

[39]全長抗体の実測等電点が7.0以下または可変領域の理論等電点が5.0以下である抗ヒトIL-6レセプター抗体、

[40]20mM Histidine-HCl, 150mM NaCl, pH6.5～7.0の緩衝液下で抗体濃度が100 mg/mLである条件下において、25℃で1ヶ月経過後の抗体の会合体比率の増加が0.3%以下であることを特徴とする抗IL-6レセプター抗体、

[41][36]～[40]のいずれかに記載の抗体を含む医薬組成物。

#### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]WTと RD\_6 のBaF/gp130中和活性を示すグラフである。

[図2]rhIL-s6R (R&D systems) と WT の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。



[図3]rhIL-s6R (R&D systems) と RD\_6 の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図4-1]WTと比較してアフィニティー・中和活性が向上するCDR変異のリストを示す図である。

[図4-2]図4-1の続きを示す図である。

[図5]組み合わせによりアフィニティー・中和活性が向上するCDR変異のリストを示す図である。

[図6]WTと RDC23 のBaF/gp130中和活性を示すグラフである。

[図7]rhIL-s6R (R&D systems) と RDC23 の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図8]rhsIL-6Rと WT の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図9]rhsIL-6Rと RDC23 の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図10]SR344 と WT の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図11]SR344 と RDC23 の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図12]WTと H53L28 のBaF/gp130中和活性を示すグラフである。

[図13]SR344 と H53/L28 の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図14]WT、H53/L28をマウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示したグラフである。

[図15]WT、H53/L28をマウスに皮下投与後の血漿中濃度推移を示したグラフである。

[図16]WTと PF1のBaF/gp130中和活性を示すグラフである。

[図17]SR344 と PF1 の相互作用のセンサーグラムを示すグラフである。

[図18]WT、PF1の高濃度安定性試験結果を示すグラフである。

[図19]WT、PF1をヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示すグラフである。

[図20]WT、PF1をヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスに静脈内投与後の非結合型のヒト可溶性IL-6レセプター濃度推移を示したグラフである。

[図21]塩酸溶出法により精製したWT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、IgG2-M397V、Ig

G4-R409Kのゲルろ過クロマトグラフィーによる会合体含量の分析結果を示すグラフである。

[図22]WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4の陽イオン交換クロマトグラフィー(IEC)分析結果を示す図である。

[図23]WT-IgG2のヒンジ領域の推定ジスルフィド結合様式を示す図である。

[図24]WT-IgG2-SKSCのヒンジ領域の推定ジスルフィド結合様式を示す図である。

[図25]WT-IgG2とIgG2-SKSCの陽イオン交換クロマトグラフィー(IEC)分析結果を示す図である。

[図26]ヒト化PM1抗体、H鎖C末端 $\Delta$ K抗体、H鎖C末端 $\Delta$ GK抗体の陽イオン交換クロマトグラフィー(IEC)分析結果を示す図である。

[図27]WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 $\Delta$ GK、WT-M17 $\Delta$ GK、WT-M11 $\Delta$ GKのFc $\gamma$ RIに対する結合量の比較を示す図である。

[図28]WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 $\Delta$ GK、WT-M17 $\Delta$ GK、WT-M11 $\Delta$ GKのFc $\gamma$ RIIaに対する結合量の比較を示すグラフである。

[図29]WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 $\Delta$ GK、WT-M17 $\Delta$ GK、WT-M11 $\Delta$ GKのFc $\gamma$ RIIbに対する結合量の比較を示すグラフである。

[図30]WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 $\Delta$ GK、WT-M17 $\Delta$ GK、WT-M11 $\Delta$ GKのFc $\gamma$ RIIIa(Val)に対する結合量の比較を示すグラフである。

[図31]WT-IgG1、WT-M14 $\Delta$ GK、WT-M17 $\Delta$ GK、WT-M11 $\Delta$ GKの高濃度安定性試験における会合体増加量を示すグラフである。

[図32]WT-IgG1、WT-M14 $\Delta$ GK、WT-M17 $\Delta$ GK、WT-M11 $\Delta$ GKの高濃度安定性試験におけるFab断片増加量を示すグラフである。

[図33]WT-IgG2とWT-M14 $\Delta$ GKとWT-M31 $\Delta$ GKの陽イオン交換クロマトグラフィー(IEC)分析結果を示す図である。

[図34]WTとF2H/L39-IgG1のBaF/gp130中和活性を示すグラフである。

[図35]カニクイザルにおいてWTとPF1とF2H/L39-IgG1を1.0mg/kg皮下投与した時の抗体血漿中濃度推移を示すグラフである。

[図36]カニクイザルにおけるWTとF2H/L39-IgG1投与群のCRP濃度推移を示すグラ

フである。

[図37]カニクイザルにおけるWTとF2H/L39-IgG1投与群の非結合型カニクイザルIL-6レセプター濃度推移を示すグラフである。

[図38]WT-IgG1およびWT-M14をヒトFcRnトランスジェニックマウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示したグラフである。

[図39]WT-IgG1、WT-M14およびWT-M58をヒトFcRnトランスジェニックマウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示したグラフである。

[図40]WT-IgG1、WT-M44、WT-M58、WT-M73のヒトFcRnトランスジェニックマウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示したグラフである。

[図41]抗IL-6レセプター抗体WT、抗IL-6レセプター抗体F2H/L39、抗IL-31レセプター抗体HOL0、抗RANKL抗体であるDNSの定常領域の及ぼすヘテロジェニティーへの影響を陽イオン交換クロマトグラフィーにより評価した図である。

[図42]抗IL-6レセプター抗体WT、抗IL-6レセプター抗体F2H/L39のCH1ドメインのシステインの及ぼすヘテロジェニティーへの影響を陽イオン交換クロマトグラフィーにより評価した図である。

[図43]抗IL-6レセプター抗体WTのCH1ドメインのシステインの及ぼす変性ピークへの影響をDSCにより評価した図である。

[図44]TOCILIZUMAB、コントロールおよびFv5-M83のBaF/gp130における中和活性を示すグラフである。

[図45]TOCILIZUMAB、Fv3-M73およびFv4-M73のBaF/gp130における中和活性を示すグラフである。

[図46]TOCILIZUMAB、コントロール、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83をカニクイザルに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示したグラフである。

[図47]TOCILIZUMAB、コントロール、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83をカニクイザルに静脈内投与後のCRP濃度推移を示したグラフである。

[図48]TOCILIZUMAB、コントロール、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83をカニクイザルに静脈内投与後の可溶型IL-6レセプターの中和率の推移を示したグラフである。

## [0014] [発明の実施の形態]

本発明は、ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABの可変領域および定常領域のアミノ酸配列を改変することで、薬効を増強させつつ、薬物動態を向上させることで投与頻度を少なくし持続的に治療効果を発揮し、且つ、免疫原性、安全性、物性を改善させ、TOCILIZUMABより優れた第2世代の分子からなる医薬組成物、並びに、それらの医薬組成物の製造方法を提供する。さらに本発明は、医薬品として用いるのに適した抗体定常領域を提供する。

[0015] 本発明は優れた抗原結合活性、中和活性、血漿中滞留性、安定性および／または均一性を有し、免疫原性リスクを低減させた抗IL-6レセプター抗体に関する。

好ましくは、抗IL-6レセプター抗体はヒト化PM-1抗体(TOCILIZUMAB)である。より具体的には本発明は、アミノ酸置換により抗原結合活性が増強したヒト化PM-1抗体、中和活性が増強したヒト化PM-1抗体、薬物動態が向上したヒト化PM-1抗体、免疫原性リスクが低下したヒト化PM-1抗体、安定性が向上したヒト化PM-1抗体、及び均一性が向上したヒト化PM-1抗体を提供する。

[0016] ヒト化PM-1抗体はヒトIL-6レセプターに結合し、ヒトIL-6とヒトIL-6レセプターの結合を阻害する。本明細書において、ヒト化PM-1抗体のアミノ酸配列と配列表の配列番号の対応は以下の通りである。

重鎖アミノ酸配列 配列番号:15

軽鎖アミノ酸配列 配列番号:16

重鎖可変領域のアミノ酸配列 配列番号:17

軽鎖可変領域のアミノ酸配列 配列番号:18

重鎖CDR1(HCDR1)のアミノ酸配列 配列番号:1

重鎖CDR2(HCDR2)のアミノ酸配列 配列番号:2

重鎖CDR3(HCDR3)のアミノ酸配列 配列番号:3

重鎖FR1(HFR1)のアミノ酸配列 配列番号:7

重鎖FR2(HFR2)のアミノ酸配列 配列番号:8

重鎖FR3(HFR3)のアミノ酸配列 配列番号:9

重鎖FR4(HFR4)のアミノ酸配列 配列番号:10



軽鎖CDR1(LCDR1)のアミノ酸配列を配列番号:4

軽鎖CDR2(LCDR2)のアミノ酸配列を配列番号:5

軽鎖CDR3(LCDR3)のアミノ酸配列を配列番号:6

軽鎖FR1(LFR1)のアミノ酸配列を配列番号:11

軽鎖FR2(LFR2)のアミノ酸配列を配列番号:12

軽鎖FR3(LFR3)のアミノ酸配列を配列番号:13

軽鎖FR4(LFR4)のアミノ酸配列を配列番号:14

[0017] <アフィニティー・中和活性増強抗体>

本発明はヒトIL-6レセプターに対する結合活性および／または中和活性が高い抗ヒトIL-6レセプター抗体を提供する。より具体的には、本発明は以下(a)～(y)に記載の抗体、及び該抗体の製造方法を提供する。

(a) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列(HCDR1)において1番目のSerが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR1を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Trp(RD\_68)、Thr(RD\_37)、Asp(RD\_8)、Asn(RD\_11)、Arg(RD\_31)、Val(RD\_32)、Phe(RD\_33)、Ala(RD\_34)、Gln(RD\_35)、Tyr(RD\_36)、Leu(RD\_38)、His(RD\_42)、Glu(RD\_45)またはCys(RD\_46)への置換が好ましい。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがTrpへ置換された配列を配列番号:26に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがThrへ置換された配列を配列番号:27に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがAspへ置換された配列を配列番号:28に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがAsnへ置換された配列を配列番号:29に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがArgへ置換された配列を配列番号:30に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがValへ置換された配列を

配列番号:31に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがPheへ置換された配列を配列番号:32に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがAlaへ置換された配列を配列番号:33に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがGlnへ置換された配列を配列番号:34に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがTyrへ置換された配列を配列番号:35に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがLeuへ置換された配列を配列番号:36に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがHisへ置換された配列を配列番号:37に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがGluへ置換された配列を配列番号:38に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがCysへ置換された配列を配列番号:39に示す。

[0018] (b) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列(HCDR1)において5番目のTrpが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR1を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Ile(RD\_9)またはVal(RD\_30)への置換が好ましい。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において5番目のTrpがIleへ置換された配列を配列番号:40に示す。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において5番目のTrpがValへ置換された配列を配列番号:41に示す。

[0019] (c) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において1番目のTyrが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR2を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Phe(RD\_82)への置換が好ましい。

配列番号:2に記載のアミノ酸配列において1番目のTyrがPheへ置換された配列を配列番号:42に示す。

- [0020] (d) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において8番目のThrが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR2を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Arg(RD\_79)への置換が好ましい。

配列番号:2に記載のアミノ酸配列において8番目のThrがArgへ置換された配列を配列番号:43に示す。

- [0021] (e) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において9番目のThrが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR2を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Ser(RD\_12)又はAsn(RD\_61)への置換が好ましい。

配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrがSerへ置換された配列を配列番号:44に示す。

配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrがAsnへ置換された配列を配列番号:45に示す。

- [0022] (f) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において1番目のSerが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Ile(RD\_2)、Val(RD\_4)、Thr(RD\_80)又はLeu(RD\_5)への置換が好ましい。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがIleへ置換された配列を配列番号:46に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがValへ置換された配列を配列番号:47に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがThrへ置換された配列を配列番号:48に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがLeuへ置換された配列を配列番号:49に示す。

- [0023] (g) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において2番目のLeuが他のアミノ酸

に置換された重鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Thr(RD\_84)への置換が好ましい。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において2番目のLeuがThrへ置換された配列を配列番号:50に示す。

[0024] (h) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において5番目のThrが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Ala(RD\_3)又はIle(RD\_83)への置換が好ましい。他の好ましい置換としては5番目のThrのSer(RDC\_14H)への置換が挙げられる。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において5番目のThrがAlaへ置換された配列を配列番号:51に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において5番目のThrがIleへ置換された配列を配列番号:52に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において5番目のThrがSerへ置換された配列を配列番号:53に示す。

[0025] (i) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において7番目のAlaが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがSer(RD\_81)又はVal(PF\_3H)への置換が好ましい。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において7番目のAlaがSerへ置換された配列を配列番号:54に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において7番目のAlaがValへ置換された配列を配列番号:55に示す。

[0026] (j) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において8番目のMetが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6受容体抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがLeu(PF\_4H)への置換が好ましい。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において8番目のMetがLeuへ置換された配列を配列番号:56に示す。



[0027] (k) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、1番目のSerをLeuに、5番目のThrをAlaに置換することが好ましい(RD\_6)。又、他の好ましい置換として、1番目のSerのValへの置換及び5番目のThrのAlaへの置換(RDC\_2H)、1番目のSerのIleへの置換及び5番目のThrのAlaへの置換(RDC\_3H)、1番目のSerのThrへの置換及び5番目のThrのAlaへの置換(RDC\_4H)、1番目のSerのValへの置換及び5番目のThrのIleへの置換(RDC\_5H)、1番目のSerのIleへの置換及び5番目のThrのIleへの置換(RDC\_6H)、1番目のSerのThrへの置換及び5番目のThrのIleへの置換(RDC\_7H)、または1番目のSerのLeuへの置換及び5番目のThrのIleへの置換(RDC\_8H)を挙げることができる。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがLeuに、5番目のThrがAlaに置換された配列を配列番号:57に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがValに、5番目のThrがAlaに置換された配列を配列番号:58に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがIleに、5番目のThrがAlaに置換された配列を配列番号:59に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがThrに、5番目のThrがAlaに置換された配列を配列番号:60に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがValに、5番目のThrがIleに置換された配列を配列番号:61に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがIleに、5番目のThrがIleに置換された配列を配列番号:62に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがThrに、5番目のThrがIleに置換された配列を配列番号:63に示す。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがLeuに、5番目のThrがIleに置換された配列を配列番号:64に示す。

[0028] (l) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において2番目のLeu、7番目のAlaおよび8番目のMetが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプ

ター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、2番目のLeuをThrに、7番目のAlaをValに、8番目のMetをLeuに置換することが好ましい(RD\_78)。

配列番号:3に記載のアミノ酸配列において2番目のLeuがThrに、7番目のAlaがValに、8番目のMetがLeuに置換された配列を配列番号:65に示す。

[0029] (m) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において1番目のArgが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR1を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがPhe(RD\_18)への置換が好ましい。

配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgがPheに置換された配列を配列番号:66に示す。

[0030] (n) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において4番目のGlnが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR1を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがArg(RD\_26)またはThr(RD\_20)への置換が好ましい。

配列番号:4に記載のアミノ酸配列において4番目のGlnがArgに置換された配列を配列番号:67に示す。

配列番号:4に記載のアミノ酸配列において4番目のGlnがThrに置換された配列を配列番号:68に示す。

[0031] (o) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において9番目のTyrが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR1を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないがPhe(RD\_73)への置換が好ましい。

配列番号:4に記載のアミノ酸配列において9番目のTyrがPheに置換された配列を配列番号:69に示す。

[0032] (p) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において11番目のAsnが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR1を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがSer(RD\_27)への置換が好ましい。

配列番号:4に記載のアミノ酸配列において11番目のAsnがSerに置換された配列を配列番号:70に示す。

[0033] (q) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列(LCDR2)において2番目のThrが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR2を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがGlyへの置換が好ましい。

配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrがGlyに置換された配列を配列番号:71に示す。

[0034] (r) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において1番目のGlnが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがGly(RD\_28)、Asn(RD\_29)またはSer(RD\_15L)への置換が好ましい。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnがGlyに置換された配列を配列番号:72に示す。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnがAsnに置換された配列を配列番号:73に示す。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnがSerに置換された配列を配列番号:74に示す。

[0035] (s) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において3番目のGlyが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがSerへの置換が好ましい。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において3番目のGlyがSerに置換された配列を配列番号:75に示す。

[0036] (t) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において9番目のTyrが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR1、かつ配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において3番目のGlyが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)における9番目のTyrはPheに置換されることが好ましく、配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)における3番目のGlyはSerに置換されることが好ましい(RD\_72)。

[0037] (u) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において5番目のThrが他のアミノ酸

に置換された軽鎖CDR3を有する抗ヒトIL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないがArg(RD\_23)またはSerへの置換が好ましい。  
。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において5番目のThrがArgに置換された配列を配列番号:76に示す。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において5番目のThrがSerに置換された配列を配列番号:77に示す。

[0038] (v) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において1番目のGlnおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換された軽鎖CDR3を有する抗IL-6レセプター抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが1番目のGlnをGlyに、5番目のThrをSerに置換することが好ましい(RD\_22)。又、他の好ましい置換として1番目のGlnのGlyへの置換及び5番目のThrのArgへの置換を挙げることができる(RDC\_11L)。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnがGlyに、5番目のThrがSerに置換された配列を配列番号:78に示す。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnがGlyに、5番目のThrがArgに置換された配列を配列番号:79に示す。

[0039] (w) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において9番目のThrが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR2、配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換された重鎖CDR3を含む抗IL-6レセプター抗体。

配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)における9番目のThrはAsnに置換されていることが好ましい。又、配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)における1番目のSerおよび5番目のThrの置換後のアミノ酸の好ましい組み合わせとして、LeuおよびAla(RDC\_27H)、ValおよびAla(RDC\_28H)、IleおよびAla(RDC\_30H)、ThrおよびAla(RDC\_4H)、ValおよびIle(RDC\_29H)、IleおよびIle(RDC\_32H)、ThrおよびIle(RDC\_7H)、LeuおよびIle(RDC\_8H)を挙げることができる。

[0040] (x) (k)に記載の重鎖CDR3を有する可変領域および(v)に記載の軽鎖CDR3を有する可変領域を含む抗体。



(y) (e)に記載の重鎖CDR2をさらに含む(x)に記載の抗体。

[0041] 本発明は少なくとも上述の(a)～(y)のいずれかに記載のアミノ酸置換を含む抗体及び該抗体の製造方法を提供する。従って本発明の抗体には、上述の(a)～(y)のいずれかに記載のアミノ酸置換に加え、上述の(a)～(y)に記載のアミノ酸置換以外のアミノ酸置換を含む抗体も含まれる。また本発明の抗体には、上述の(a)～(y)のいずれかに記載のアミノ酸置換が複数組み合わされた抗体も含まれる。上述の(a)～(y)に記載のアミノ酸置換としては、上述のCDRアミノ酸配列の他アミノ酸への置換が挙げられる。上述の(a)～(y)に記載のアミノ酸置換以外のアミノ酸置換としては、例えば、他CDR部分のアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が挙げられる。また、FRのアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が挙げられる。また、定常領域のアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が挙げられる。

[0042] また本発明の抗体には、本発明で見出された高アフィニティーCDRを、ヒト化PM-1抗体以外の如何なるフレームワークに移植した抗体も含まれる。また本発明の抗体には、本発明で見出された高アフィニティーCDRをヒト化PM-1抗体以外のフレームワークに移植した結果アフィニティーが低下した抗体において、元のアフィニティーの抗体を得るためにフレームワーク部分に変異が導入(例えば、Curr Opin Biotechnol. 1994 Aug;5(4):428-33参照)された抗体、および、元のアフィニティーの抗体を得るためにCDR部分に変異が導入(例えば、US2006/0122377参照)された抗体が含まれる。

[0043] 本発明においては、上述の(a)～(y)のいずれかに記載のアミノ酸置換は、ヒト化PM-1抗体に対して行うことが好ましい。ヒト化PM-1抗体において、上述の(a)～(y)のいずれかに記載のアミノ酸置換が行われた抗体は、IL-6レセプターに対する高い中和活性を有する。ヒト化PM-1抗体において、上述の(a)～(y)のいずれかに記載のアミノ酸置換が行われた抗体は、IL-6が関連する関節リウマチ等の炎症性疾患などの治療薬として有効である。

[0044] なお、上述の(a)～(y)のいずれかに記載のアミノ酸置換を含む抗体は、例えば下記(1)又は(2)ように表現することも出来る。ここでは(a)の抗体を例に記載するが、(b)～(y)の抗体についても同様に表現することが出来る。

(1)配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を有するCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体

(2)CDR1として、配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されているアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体

[0045] <結合活性が増強した抗体>

本発明はさらにIL-6レセプターへの結合活性が高い抗IL-6レセプター抗体を提供する。本発明においてIL-6レセプターへの結合活性が高い抗IL-6レセプター抗体とは、通常、生理条件下、37°Cにおいて測定されるアフィニティーが1nM以下の抗体であり、好ましくはアフィニティーが0.1nM以下の抗体であり、さらに好ましくはアフィニティーが0.04nM以下の抗体である。このようなIL-6レセプターへの結合活性が高い抗IL-6レセプター抗体は、抗原の生物的作用の中和能が向上していると考えられる。

本発明のIL-6レセプターへの結合活性が高い抗IL-6レセプター抗体において、導入されるアミノ酸置換は特に限定されないが、例えば上述のアミノ酸置換が挙げられる。

IL-6レセプターは特に限定されないが、ヒトIL-6レセプターが好ましい。

結合活性の測定は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、例えばSPRを用いたBiacore(BIACORE)等により測定することが可能である。

[0046] <CDR配列の免疫原性リスクを低下させた抗体>

また本発明は、免疫原性が低下した抗IL-6レセプター抗体、特にヒト化PM-1抗体を提供する。抗体配列中にHLAに結合するT-cellエピトープが存在すると抗体の免疫原性が高くなると考えられている。従って、抗体の配列を置換して抗体配列中に存在するT-cellエピトープを除去することにより抗体の免疫原性リスクを低下させることができる。

[0047] 本発明は抗体のアミノ酸配列、特にCDR配列中のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することによりT-cellエピトープが除去され、免疫原性が低下したヒト化抗ヒトIL-6レセプター抗体、特にヒト化PM-1軽鎖可変領域を提供する。また本発明は、該軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

より具体的には本発明は、配列番号:5に記載のアミノ酸配列(LCDR2)において2

番目のThrが他のアミノ酸に置換した軽鎖CDR2を提供する。また、本発明は該軽鎖CDR2を含む軽鎖可変領域を提供する。また本発明は、該軽鎖可変領域を含む抗IL-6レセプター抗体を提供する。置換後のアミノ酸配列は特に限定されないが、Glyへの置換が好ましい。配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrがGlyに置換された配列を配列番号:71に示す。該アミノ酸置換はヒト化PM-1抗体の軽鎖可変領域において行われることが好ましい。

[0048] <H53/L28のFRおよびCDR>

本発明はまた、薬物動態、安定性および／または免疫原性が改善された抗ヒトIL-6レセプター抗体を提供する。IgGにおいては、同一のFc領域を有するIgGの血漿中半減期がpIと高い相関係数で相関することが見出されている。そこで、異なる抗原に対する2種類の抗体において可変領域のpIを改変することを試みたところ、抗原の種類に関係なくFc領域を改変することなく血漿中半減期を制御することに成功した。抗体の内皮細胞への非特異的な取り込みの速度は、負電荷を帯びた細胞表面とIgGの物理化学的なクーロン相互作用に依存すると考えられる。IgGのpIを低下させることでクーロン相互作用が低減し、内皮細胞への非特異的な取り込みが減少し、結果として内皮細胞における代謝を減少させることで薬物動態を向上させることが可能となる。

[0049] 即ち本発明は、抗IL-6レセプター抗体、特にヒト化PM-1抗体のアミノ酸配列を置換することにより、等電点を低下させ、薬物動態を向上させた抗ヒトIL-6レセプター抗体を提供する。具体的には、Kabatナンバリング(Kabat EA et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)において、ヒト化PM-1のH13(配列番号:7の13番目のアミノ酸)、H16(配列番号:7の16番目のアミノ酸)、H43(配列番号:8の8番目のアミノ酸)、H81(配列番号:9の16番目のアミノ酸)、H105(配列番号:10の3番目のアミノ酸)、L18(配列番号:11の18番目のアミノ酸)、L45(配列番号:12の11番目のアミノ酸)、L79(配列番号:13の23番目のアミノ酸)、L107(配列番号:14の10番目のアミノ酸)、H31(配列番号:1の1番目のアミノ酸)、L24(配列番号:4の1番目のアミノ酸)および／またはL53(配列番号:5の4番目のアミノ酸)を等電点が低下する他のアミノ酸に置換する。このことにより、ヒト化PM-1の結合活性や安定性に影響を与えることなく等電点を低下させることが可能である。またヒト化PM-1抗体では、マウ

ス配列をヒト化する際に、結合活性保持の為に幾つかのアミノ酸残基がマウス配列のまま残されている。具体的には、上述のKabatナンバリングにおいて、ヒト化PM-1抗体中のH27(配列番号:7の27番目のアミノ酸)、H28(配列番号:7の28番目のアミノ酸)、H29(配列番号:7の29番目のアミノ酸)、H30(配列番号:7の30番目のアミノ酸)およびH71はマウス配列がそのまま利用されている。HFR1に関してはH13、H16、H23、H30を置換することによりHFR1としてヒト配列に変換することが可能で、ヒト化抗体PM-1よりさらに免疫原性リスクが低下した抗体を作製することが可能と考えられる。さらに、ヒト化PM-1は、CDRグラフティングによりヒト化された抗体であることから、安定性に関しては改善の余地があると考えられる。例えば、抗体の可変領域において表面に露出しているアミノ酸残基を親水性のアミノ酸に置換することにより、抗体を安定化することが可能であると考えられる。さらにCDR配列をコンセンサス配列に改変することによっても、抗体を安定化することが可能である。ヒト化PM-1抗体においては、上述のKabatナンバリングにおいて、H69(配列番号:9の4番目のアミノ酸)のMetからIleへの置換(疎水コア構造の安定化)、H70(配列番号:9の5番目のアミノ酸)のLeuからSerへの置換(表面露出残基の親水化)、H58(配列番号:2の9番目のアミノ酸)のThrからAsnへの置換(重鎖CDR2のコンセンサス配列への改変)、H65(配列番号:2の16番目のアミノ酸)のSerからGlyへの置換( $\beta$ ターン部分へのGlyへの置換、重鎖CDR2のコンセンサス配列への改変)、またはL93(配列番号:6の5番目のアミノ酸)のThrからSerへの置換(表面露出残基の親水化)により抗体を安定化することが可能である。また、上述のLCDR2(配列番号:5)の2番目であるL51のThrをGlyに置換することで、結合活性や安定性に影響を与えることなくin silicoで予測されたT-cellエピトープを除去することによる免疫原性リスクを低下させることが可能である。これらのアミノ酸置換を組み合わせて、抗体の薬物動態、免疫原性、安定性が改善した抗IL-6レセプター抗体を得ることが可能である。

[0050] このような抗体の例として、下記(1)～(37)のいずれかに記載の抗体が挙げられる。

(1)配列番号:7に記載のアミノ酸配列において13番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体。



置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがLysへの置換が好ましい。

配列番号:7に記載のアミノ酸配列において13番目のArgがLysへ置換された配列を配列番号:80に示す。

(2)配列番号:7に記載のアミノ酸配列において16番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがGluへの置換が好ましい。

配列番号:7に記載のアミノ酸配列において16番目のGlnがGluへ置換された配列を配列番号:81に示す。

(3)配列番号:7に記載のアミノ酸配列において23番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがAlaへの置換が好ましい。

配列番号:7に記載のアミノ酸配列において23番目のThrがAlaへ置換された配列を配列番号:82に示す。

(4)配列番号:7に記載のアミノ酸配列において30番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがSerへの置換が好ましい。

配列番号:7に記載のアミノ酸配列において30番目のThrがSerへ置換された配列を配列番号:83に示す。

(5)配列番号:7に記載のアミノ酸配列において13番目のArg、16番目のGln、23番目のThrおよび30番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、13番目のArgはLys、16番目のGlnはGlu、23番目のThrはAla、30番目のThrはSerへの置換が好ましい。

配列番号:7に記載のアミノ酸配列において13番目のArgがLys、16番目のGlnがGlu、23番目のThrがAla、30番目のThrがSerへ置換された配列を配列番号:84に示す。

(6)配列番号:8に記載のアミノ酸配列において8番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR2を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

配列番号:8に記載のアミノ酸配列において8番目のArgがGluへ置換された配列を配列番号:85に示す。

(7)配列番号:9に記載のアミノ酸配列において4番目のMetが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Ileへの置換が好ましい。

配列番号:9に記載のアミノ酸配列において4番目のMetがIleへ置換された配列を配列番号:86に示す。

(8)配列番号:9に記載のアミノ酸配列において5番目のLeuが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

配列番号:9に記載のアミノ酸配列において5番目のLeuがSerへ置換された配列を配列番号:87に示す。

(9)配列番号:9に記載のアミノ酸配列において16番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないがLysへの置換が好ましい。

配列番号:9に記載のアミノ酸配列において16番目のArgがLysへ置換された配列を配列番号:88に示す。

(10)配列番号:9に記載のアミノ酸配列において27番目のValが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがAlaへの置換が好ましい。

配列番号:9に記載のアミノ酸配列において27番目のValがAlaへ置換された配列を配列番号:89に示す。

(11)配列番号:9に記載(HFR3)のアミノ酸配列において4番目のMet、5番目のLeu、16番目のArgおよび27番目のValが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、4番目のMetはIle、5番目のLeuはSer、16番目のArgはLys、27番目のValはAlaへの置換が好ましい。

配列番号:9に記載のアミノ酸配列において4番目のMetがIle、5番目のLeuがSer、16番目のArgがLys、27番目のValがAlaへ置換された配列を配列番号:90に示す。

(12)配列番号:10に記載(HFR4)のアミノ酸配列において3番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

配列番号:10に記載のアミノ酸配列において3番目のGlnがGluへ置換された配列を配列番号:91に示す。

(13)配列番号:11に記載(LFR1)のアミノ酸配列において18番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

配列番号:11に記載のアミノ酸配列において18番目のArgがSerへ置換された配列を配列番号:92に示す。

(14)配列番号:12に記載(LFR2)のアミノ酸配列において11番目のLysが他のアミノ酸に置換されたFR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

配列番号:12に記載のアミノ酸配列において11番目のLysがGluへ置換された配列を配列番号:93に示す。

(15)配列番号:13に記載のアミノ酸配列において23番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

配列番号:13に記載のアミノ酸配列において23番目のGlnがGluへ置換された配列を配列番号:94に示す。

(16)配列番号:13に記載のアミノ酸配列において24番目のProが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがAlaへの置換が好ましい。

配列番号:13に記載のアミノ酸配列において24番目のProがAlaへ置換された配列を配列番号:95に示す。

(17)配列番号:13に記載のアミノ酸配列において27番目のIleが他のアミノ酸に置

換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸配列は特に限定されないがAlaへの置換が好ましい。

配列番号:13に記載のアミノ酸配列において27番目のIleがAlaへ置換された配列を配列番号:96に示す。

(18)配列番号:13に記載(LFR3)のアミノ酸配列において23番目のGln、24番目のProおよび27番目のIleが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、23番目のGlnはGlu、24番目のProはAla、27番目のIleはAlaへの置換が好ましい。

配列番号:13に記載のアミノ酸配列において23番目のGlnがGlu、24番目のProがAla、27番目のIleがAlaへ置換された配列を配列番号:97に示す。

(19)配列番号:14に記載(LFR4)のアミノ酸配列において10番目のLysが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

配列番号:14に記載のアミノ酸配列において10番目のLysがGluへ置換された配列を配列番号:98に示す。

(20)配列番号:10に記載(HFR4)のアミノ酸配列において5番目のSerが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Thrへの置換が好ましい。

配列番号:10に記載のアミノ酸配列において5番目のSerがThrに置換された配列を配列番号:132に示す。

(21)配列番号:10に記載(HFR4)のアミノ酸配列において3番目のGlnおよび5番目のSerが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、3番目のGlnはGlu、5番目のSerはThrへの置換が好ましい。

配列番号:10に記載のアミノ酸配列において3番目のGlnがGluへ、5番目のSerがThrへ置換された配列を配列番号:133に示す。

(22)(5)、(6)、(11)および(21)に記載のアミノ酸置換が行われたヒト化PM-1重鎖



可変領域を含む抗体。

(23) (13)、(14)、(18)および(19)に記載のアミノ酸置換が行われたヒト化PM-1軽鎖可変領域を含む抗体。

(24) (22)に記載の重鎖可変領域および(23)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

(25) 配列番号:1に記載(HCDR1)のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Aspへの置換が好ましい。

配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerがAspへ置換された配列を配列番号:28に示す。

(26) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Glyへの置換が好ましい。

配列番号:2に記載のアミノ酸配列において16番目のSerがGlyへ置換された配列を配列番号:99に示す。

(27) 配列番号:2に記載(HCDR2)のアミノ酸配列において9番目のThrおよび16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、9番目のThrはAsn、16番目のSerはGlyへの置換が好ましい。

配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrがAsn、16番目のSerがGlyへ置換された配列を配列番号:100に示す。

(28) 配列番号:4に記載(LCDR1)のアミノ酸配列において1番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Glnへの置換が好ましい。

配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgがGlnへ置換された配列を配列番号:101に示す。

(29) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

配列番号:5に記載のアミノ酸配列において4番目のArgがGluへ置換された配列を配列番号:102に示す。

(30)配列番号:5に記載(LCDR2)のアミノ酸配列において2番目のThrおよび4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、2番目のThrはGly、4番目のArgはGluへの置換が好ましい。

配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrがGly、4番目のArgがGluへ置換された配列を配列番号:103に示す。

(31)配列番号:6に記載(LCDR3)のアミノ酸配列において5番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

配列番号:6に記載のアミノ酸配列において5番目のThrがSerへ置換された配列を配列番号:77に示す。

(32)(25)および(27)に記載のアミノ酸置換が行われた重鎖可変領域を含む抗体。

(33)(28)、(30)および(31)に記載のアミノ酸置換が行われた軽鎖可変領域を含む抗体。

(34)(32)に記載の重鎖可変領域と(33)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

(35)配列番号:104に記載(H53/L28のVH)のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

(36)配列番号:105に記載(H53/L28のVL)のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

(37)(35)に記載の重鎖可変領域および(36)に記載の軽鎖可変領域を有する抗体。

[0051] 上述の(1)～(37)のいずれかに記載のアミノ酸置換はヒト化PM-1抗体に対して行われることが好ましい。本発明は少なくとも上述の(1)～(37)のいずれかに記載のアミノ酸置換を含む抗体及び該抗体の製造方法を提供する。従って本発明の抗体には、上述の(1)～(37)のいずれかに記載のアミノ酸置換に加え、上述の(1)～(37)に記載のアミノ酸置換以外のアミノ酸置換を含む抗体も含まれる。また本発明の抗体には、上述の(1)～(37)のいずれかに記載のアミノ酸置換が複数組み合わせられた抗

体も含まれる。上述の(1)～(37)に記載のアミノ酸置換としては、例えば、上述のFRおよびCDRのアミノ酸配列の置換が挙げられる。上述の(1)～(37)に記載のアミノ酸置換以外のアミノ酸置換としては、上述以外のFRおよびCDR配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が挙げられる。また、定常領域のアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が挙げられる。

さらに、上述のアミノ酸改変以外の、抗IL-6レセプター抗体の活性を低下させることなく等電点を低下させる改変としては、例えば、配列番号:2に記載のアミノ酸配列において15番目のLysおよび／または16番目のSerを他のアミノ酸に置換する改変が挙げられる。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、15番目のLysはGlnに、16番目のSerはAspに置換することが好ましい。配列番号:2のアミノ酸配列において15番目のLysがGlnに、16番目のSerがAspに置換された配列を配列番号:121に示す。又、このようなアミノ酸置換は配列番号:100に記載のアミノ酸配列に対して行われてもよい。配列番号:100のアミノ酸配列において、15番目のLysがGlnに、16番目のGlyがAspに置換された配列を配列番号:122に示す。従って、本発明は配列番号:2または配列番号100のアミノ酸配列において15番目のLysおよび／または16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

さらに、等電点を低下させる他の改変としては、配列番号:4に記載のアミノ酸配列において4番目のGlnを他のアミノ酸に置換する改変が挙げられる。置換後のアミノ酸は特に限定されないがGluへの置換が好ましい。配列番号:4のアミノ酸配列において、4番目のGlnがGluに置換されたアミノ酸配列を配列番号:123に示す。又、このアミノ酸置換は配列番号:101のアミノ酸配列に対して行われてもよい。配列番号:101のアミノ酸配列において4番目のGlnがGluに置換されたアミノ酸配列を配列番号:124に示す。従って、本発明は配列番号:4または配列番号101のアミノ酸配列において4番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

さらに、等電点を低下させる他の改変として、配列番号:5に記載のアミノ酸配列において6番目のHisを他のアミノ酸に置換する改変が上げられる。置換後のアミノ酸は特に限定されないがGluへの置換が好ましい。配列番号:5に記載のアミノ酸配列に

において6番目のHisがGluに置換されたアミノ酸配列を配列番号:125に示す。又、このアミノ酸置換は配列番号:103のアミノ酸配列に対して行われてもよい。配列番号:103のアミノ酸配列において6番目のHisがGluに置換されたアミノ酸配列を配列番号:126に示す。従って、本発明は配列番号:5または配列番号:103のアミノ酸配列において6番目のHisが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

さらに、配列番号:90に記載の重鎖FR3のアミノ酸配列において、免疫原性リスクを低減させる改変として、27番目 (KabatナンバリングH89) のAlaをValに置換する改変を挙げることができる。配列番号:90に記載のアミノ酸配列において27番目のAlaがValに置換されたアミノ酸配列を配列番号:127に示す。従って、本発明は配列番号:90のアミノ酸配列において27番目のAlaがValに置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

また、配列番号:9または配列番号:90に記載の重鎖FR3のアミノ酸配列において唯一残存するマウス配列である6番目 (KabatナンバリングH71) のArgに関して、H71がArgで保存されているヒトVH1サブクラス (配列番号:128)、あるいは、ヒトVH3サブクラス (配列番号:129) のヒト配列をFR3配列として用いることで、フレームワークとしては完全にヒト配列である抗ヒトIL-6レセプター抗体を作製可能であると考えられる。従って、本発明は配列番号:128または配列番号:129に記載のFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

さらに、配列番号:10に記載の重鎖FR4のアミノ酸配列において、安定性を向上させる改変として、5番目 (KabatナンバリングH107) のSerをIleに置換する改変を挙げることができる。配列番号:10に記載のアミノ酸配列において5番目のSerがIleに置換されたアミノ酸配列を配列番号:130に示す。又、このアミノ酸配列は配列番号:91のアミノ酸配列に対して行われてもよい。配列番号:91に記載のアミノ酸配列において5番目のSerがIleに置換されたアミノ酸配列を配列番号:131に示す。従って、本発明は配列番号:10または配列番号:91のアミノ酸配列において5番目のSerがIleに置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

このようなアミノ酸置換はヒト化PM-1抗体、H53/L28 (配列番号:104の重鎖可変領



域、配列番号:105の軽鎖可変領域を含む抗体)、あるいはPF1抗体(配列番号:22の重鎖可変領域、配列番号:23の軽鎖可変領域を含む抗体)に対して行われることが好ましい。本発明は少なくともこのようなアミノ酸置換を含む抗体及び該抗体の製造方法を提供する。従って本発明の抗体には、このようなアミノ酸置換に加え、上述の(1)～(37)に記載のアミノ酸置換および／または上述の(1)～(37)以外のアミノ酸置換を含む抗体も含まれる。上述の(1)～(37)に記載のアミノ酸置換以外のアミノ酸置換としては、上述以外のFRおよびCDR配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が挙げられる。また、定常領域のアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が挙げられる。

[0052] <等電点の低い抗ヒトIL-6レセプター抗体>

本発明はさらに等電点の低い抗IL-6レセプター抗体を提供する。本発明の等電点の低い抗体には全長抗体の実測等電点の低い抗体および可変領域(VH/VL)の理論等電点の低い抗体が含まれる。

本発明において全長抗体の実測等電点の低い抗IL-6レセプター抗体とは、通常、実測等電点が7.5以下の抗体であり、好ましくは実測等電点が7.0以下の抗体であり、さらに好ましくは実測等電点が6.0以下の抗体である。実測等電点は当業者に公知の方法で測定することが可能であり、例えば、非変性ゲル等電点電気泳動やキャピラリー等電点電気泳動等の方法により測定することが可能である。

本発明において可変領域の理論等電点の低い抗IL-6レセプター抗体とは、通常、理論等電点が5.5以下の抗体であり、好ましくは理論等電点が5.0以下の抗体であり、さらに好ましくは理論等電点が4.0以下の抗体である。理論等電点は当業者に公知の方法により算出することが可能であり、例えば、GENETYX(GENETYX CORPORATION)等のソフトを用いることにより可変領域のVHおよびVLの理論等電点を算出することが可能である。

本発明の等電点が低い抗IL-6レセプター抗体において、導入されるアミノ酸置換は特に限定されないが、例えば、上述のアミノ酸置換が挙げられる。このような等電点が低い抗IL-6レセプター抗体は薬物動態が向上していると考えられる。

IL-6レセプターは特に限定されないが、ヒトIL-6レセプターが好ましい。

[0053] <高濃度において安定な抗ヒトIL-6レセプター抗体>

さらに本発明は高濃度において安定な抗IL-6レセプター抗体を提供する。

本発明において“高濃度において安定”とは、皮下投与に適したpH6.5～7.0の範囲内の適切に選択された緩衝液条件(例えば、20mM histidine-HCl, 150mM NaCl)において、抗IL-6レセプター抗体100mg/mLの高濃度抗体溶液の25℃での1ヶ月あたりの会合体比率(ゲルろ過クロマトグラフィー上の会合体ピークエリア/トータルピークエリア×100)の増加が0.3%以下、好ましくは0.2%以下、さらに好ましくは0.1%以下であることを意味する。なお、抗IL-6レセプター抗体の濃度は100mg/mL以上であればよく、例えば、200mg/mLや300mg/mLなどであってもよい。

本発明の高濃度において安定な抗IL-6レセプター抗体は、特に限定されないが、例えば上述のアミノ酸置換等により作製することが可能である。

IL-6レセプターは特に限定されないが、ヒトIL-6レセプターが好ましい。

[0054] 本発明はまた、上述の(1)～(37)のいずれかに記載のアミノ酸置換が行われたヒト化PM-1抗体に、さらに上述の(a)～(y)のいずれかに記載の結合活性および/または中和活性を向上させるアミノ酸置換を行った抗体を提供する。このような抗体の一態様としては、配列番号:22に記載(PF1\_H)のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号:23に記載(PF1\_L)のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体(PF1)が挙げられるが、これに限定されない。

[0055] さらに本発明は以下の抗体の(A)～(I)いずれかに記載の抗IL-6受容体抗体を提供する。

- (A) 配列番号:165に記載のアミノ酸配列(VH5-M83のCDR1)を有するCDR1、配列番号:166に記載のアミノ酸配列(VH5-M83のCDR2)を有するCDR2、配列番号:167に記載のアミノ酸配列(VH5-M83のCDR3)を有するCDR3を有する重鎖可変領域、
- (B) 配列番号:101に記載のアミノ酸配列(VL5のCDR1)を有するCDR1、配列番号:168に記載のアミノ酸配列(VL5のCDR2)を有するCDR2、配列番号:79に記載のアミノ酸配列(VL5のCDR3)を有するCDR3を有する軽鎖可変領域、
- (C) (A)の重鎖可変領域および(B)の軽鎖可変領域を含む抗体、
- (D) 配列番号:169に記載のアミノ酸配列(VH3-M73のCDR1)を有するCDR1、配列

番号:170に記載のアミノ酸配列(VH3-M73のCDR2)を有するCDR2、配列番号:171に記載のアミノ酸配列(VH3-M73のCDR3)を有するCDR3を有する重鎖可変領域、  
(E) 配列番号:172に記載のアミノ酸配列(VL3のCDR1)を有するCDR1、配列番号:173に記載のアミノ酸配列(VL3のCDR2)を有するCDR2、配列番号:79に記載のアミノ酸配列(VL3のCDR3)を有するCDR3を有する軽鎖可変領域、  
(F) (D)の重鎖可変領域および(E)の軽鎖可変領域を有する含む抗体、  
(G) 配列番号:169に記載のアミノ酸配列(VH4-M73のCDR1)を有するCDR1、配列番号:174に記載のアミノ酸配列(VH4-M73のCDR2)を有するCDR2、配列番号:171に記載のアミノ酸配列(VH4-M73のCDR3)を有するCDR3を有する重鎖可変領域、  
(H) 配列番号:175に記載のアミノ酸配列(VL1のCDR1)を有するCDR1、配列番号:173に記載のアミノ酸配列(VL1のCDR2)を有するCDR2、配列番号:79に記載のアミノ酸配列(VL1のCDR3)を有するCDR3を有する軽鎖可変領域、  
(I) (G)の重鎖可変領域および(H)の軽鎖可変領域を含む抗体。

[0056] さらに本発明は以下の(a)～(q)いずれかに記載の抗IL-6受容体抗体を提供する。

- (a) 配列番号:159に記載のアミノ酸配列(H96-IgG1可変領域)を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (b) 配列番号:159に記載のアミノ酸配列(H96-IgG1可変領域)において、35番目のTrp、51番目のTyr、63番目のSer、65番目のLys、66番目のGly、99番目のVal、103番目のIle、108番目のTyr、111番目のGlu、113番目のThrのうち少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (c) 配列番号:159に記載のアミノ酸配列(H96-IgG1可変領域)において、65番目のLys、66番目のGly、99番目のVal、103番目のIle、111番目のGlu、113番目のThrが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (d) 配列番号:159に記載のアミノ酸配列(H96-IgG1可変領域)において、35番目のTrp、51番目のTyr、63番目のSer、65番目のLys、66番目のGly、99番目のVal、103番目のIle、108番目のTyrが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (e) 配列番号:160に記載のアミノ酸配列(F2H-IgG1可変領域)を有する重鎖可変領域を含む抗体、

域を含む抗体、

(f) 配列番号:161に記載のアミノ酸配列(VH5-M83可変領域)を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(g) 配列番号:23に記載のアミノ酸配列(PF1L)において27番目のGln及び／又は55番目のHisが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体、

(h) 配列番号:162に記載のアミノ酸配列(L39可変領域)を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(i) 配列番号:163に記載のアミノ酸配列(VL5-kappa可変領域)を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(j) 配列番号:176に記載のアミノ酸配列(VH3-M73可変領域)を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(k) 配列番号:178に記載のアミノ酸配列(VH4-M73可変領域)を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(l) 配列番号:177に記載のアミノ酸配列(VL3-kappa可変領域)を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(m) 配列番号:179に記載のアミノ酸配列(VL1-kappa可変領域)を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(n) (e)の重鎖可変領域と(h)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(o) (f)の重鎖可変領域と(i)の軽鎖可変領域を含む抗体(FV5-M83の可変領域組み合わせ)、

(p) (j)の重鎖可変領域と(l)の軽鎖可変領域を含む抗体(FV4-M73の可変領域組み合わせ)、

(q) (k)の重鎖可変領域と(m)の軽鎖可変領域を含む抗体(FV3-M73の可変領域組み合わせ)。

[0057] 上述の(a)～(d)の重鎖可変領域のアミノ酸置換において、置換後のアミノ酸は特に限定されないが、35番目のTrpはVal、51番目のTyrはPhe、63番目のSerはThr、65番目のLysはGln、66番目のGlyはAsp、99番目のValはLeu、103番目のIleはAla、108番



目のTyrはVal、111番目のGluはGln、113番目のThrはIleに置換されることが好ましい。又、上述の(g)の軽鎖可変領域のアミノ酸置換において、置換後のアミノ酸は特に限定されないが、27番目のGlnはGluに、55番目のHisはGluに置換されることが好ましい。又、上述のアミノ酸置換以外のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加などが行われてもよい。

[0058] 本発明の抗体の定常領域は特に限定されず、如何なる定常領域が用いられてもよい。例えば、IgG1、IgG2、IgG4などの天然配列を有する定常領域や、天然配列を有する定常領域中のアミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入などを行うことにより作製された改変型の定常領域などを用いることができる。改変型の定常領域の例としては、後述する定常領域を挙げることができる。

又、上述の本発明の可変領域を用いた抗体の例として、以下の抗体を挙げることができる。

- (1) 配列番号:134に記載のアミノ酸配列(H96-IgG1)を有する重鎖を含む抗体、
- (2) 配列番号:135に記載のアミノ酸配列(F2H-IgG1)を有する重鎖を含む抗体、
- (3) 配列番号:137に記載のアミノ酸配列(VH5-IgG1)を有する重鎖を含む抗体、
- (4) 配列番号:139に記載のアミノ酸配列(VH5-M83)を有する重鎖を含む抗体、
- (5) 配列番号:136に記載のアミノ酸配列(L39)を有する軽鎖を含む抗体、
- (6) 配列番号:138に記載のアミノ酸配列(VL5-kappa)を有する軽鎖を含む抗体、
- (7) 配列番号:180に記載のアミノ酸配列(VH3-M73)を有する重鎖を含む抗体、
- (8) 配列番号:182に記載のアミノ酸配列(VH4-M73)を有する重鎖を含む抗体、
- (9) 配列番号:181に記載のアミノ酸配列(VL3-kappa)を有する軽鎖を含む抗体、
- (10) 配列番号:183に記載のアミノ酸配列(VL1-kappa)を有する軽鎖を含む抗体、
- (11) (2)の重鎖と(5)の軽鎖を含む抗体、
- (12) (3)の重鎖と(6)の軽鎖を含む抗体、
- (13) (4)の重鎖と(6)の軽鎖を含む抗体(FV5-M83)、
- (14) (7)の重鎖と(9)の軽鎖を含む抗体(FV4-M73)、
- (15) (8)の重鎖と(10)の軽鎖を含む抗体(FV3-M73)、
- (16) (1)～(15)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体。

ここで、「同等の活性を有する」とは抗原への結合活性及び／又は中和活性が同等であることを言う。本発明において同等の活性とは必ずしも同一の活性である必要はなく、例えば50%以上の活性、好ましくは70%以上の活性、さらに好ましくは90%以上の活性を有していることをいう。

[0059] さらに、本発明は以下の(i)～(xxii)いずれかに記載のCDRまたはFRを提供する。

(i) 配列番号:84に記載のアミノ酸配列を有する重鎖FR1(VH5の重鎖FR1)、

(ii) 配列番号:186に記載のアミノ酸配列を有する重鎖FR1(VH3、VH4の重鎖FR1)

、

(iii) 配列番号:85に記載のアミノ酸配列を有する重鎖FR2(VH3、VH4、VH5の重鎖FR2)、

(iv) 配列番号:184に記載のアミノ酸配列を有する重鎖FR3(VH3、VH4、VH5の重鎖FR3)、

(v) 配列番号:133に記載のアミノ酸配列を有する重鎖FR4(VH3、VH4、VH5の重鎖FR4)、

(vi) 配列番号:92に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖FR1(VL1、VL3、VL5の軽鎖FR1)、

(vii) 配列番号:93に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖FR2(VL1、VL3、VL5の軽鎖FR2)、

(viii) 配列番号:97に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖FR3(VL1、VL3、VL5の軽鎖FR3)、

(ix) 配列番号:98に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖FR4(VL1、VL3、VL5の軽鎖FR4)、

(x) 配列番号:169に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1(VH3、VH4の重鎖CDR1)、

(xi) 配列番号:165に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1(VH5の重鎖CDR1)、

(xii) 配列番号:170に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2(VH3の重鎖CDR2)、

(xiii) 配列番号:174に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2(VH4の重鎖CDR2)

、

- (xiv) 配列番号:166に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2 (VH5の重鎖CDR2)、
- (xv) 配列番号:171に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3 (VH3、VH4の重鎖CDR3)、
- (xvi) 配列番号:167に記載のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3 (VH5の重鎖CDR3)、
- (xvii) 配列番号:175に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1 (VL1の軽鎖CDR1)、
- (xviii) 配列番号:172に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1 (VL3の軽鎖CDR1)、
- (xix) 配列番号:101に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1 (VL5の軽鎖CDR1)、
- (xx) 配列番号:173に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2 (VL1、VL3の軽鎖CDR2)、
- (xxi) 配列番号:168に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2 (VL5の軽鎖CDR2)、
- (xxii) 配列番号:79に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3 (VL1、VL3、VL5の軽鎖CDR3)。

[0060] また本発明の抗体には、上述のいずれかに記載のアミノ酸置換を含む抗体の断片やその修飾物も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)、H鎖単独ドメインやL鎖単独ドメイン(例えば、Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126-36.)、Unibody(WO2007059782 A1)、SMIP(WO2007014278 A2)が挙げられる。また抗体の由来としては、特に限定されないが、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体などを挙げる事ができる。又、本発明の抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト化抗体等であってもよい。

具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 17

8, 476-496、Pluckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照)。

[0061] scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0062] <抗体定常領域>

本発明はまた、以下(i)～(xxi)のいずれかに記載のアミノ酸が置換され改良された抗体定常領域を提供する。定常領域とはIgG1、IgG2、IgG4タイプの定常領域のことを意味する。ヒトIgG1定常領域、ヒトIgG2定常領域およびヒトIgG4定常領域のアミノ酸配列は公知である(ヒトIgG1定常領域:配列番号:19、ヒトIgG2定常領域:配列番号:20、ヒトIgG4定常領域:配列番号:21)。なお、ヒトIgG4定常領域は、ヒンジ部分の安定性を改善するための改変(Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8.)を導入した配列である。さらに本発明は、該アミノ酸が置換された抗体定常領域を含む抗体を提供する。抗体定常領域は好ましくはヒト抗体定常領域である。

なお本発明のアミノ酸が置換された抗体定常領域は、下記(i)～(xxi)のいずれかに記載のアミノ酸置換を含むものである限り、他のアミノ酸置換や修飾を含んでもよい。従って、本発明においては、配列番号:20に記載のアミノ酸配列から既に1又は複数のアミノ酸が置換および／または修飾されたIgG2定常領域に対して本発明のアミノ酸置換を行う場合、又は本発明のアミノ酸置換を行った後に1または複数のアミノ酸を置換および／または修飾する場合も、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域に本発明のアミノ酸置換が行われたIgG2定常領域に該当する。配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域、配列番号:21に記載のIgG4定常領域についても同様である。



またEUナンバリング (Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242 を参照) の297番目の糖鎖は如何なる糖鎖構造であってもよく、また糖鎖が結合していなくてもよい (例えば大腸菌など、糖鎖が付加されない宿主細胞で生産された定常領域など)。

[0063] (i) IgG2定常領域の酸性での安定性改善

本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域の一態様としては、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、276番目 (EUナンバリングの397番目) のMetが他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域が挙げられる。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Valへの置換であることが好ましい。配列番号:20に記載のアミノ酸配列において276番目 (EUナンバリングの397番目) のMetを他のアミノ酸に置換することにより、抗体の酸性条件化での安定性を向上させることが可能である。

[0064] (ii) IgG2定常領域のヘテロジェニティーの改善

また本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域の一態様としては、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、14番目 (EUナンバリング131番目) のCys、16番目 (EUナンバリングの133番目) のArg、および、102番目 (EUナンバリングの219番目) のCysが他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域が挙げられる。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目 (EUナンバリング131番目) のCysはSerに置換されることが好ましく、16番目 (EUナンバリングの133番目) のArgはLysに置換されることが好ましく、102番目 (EUナンバリングの219番目) のCysはSerに置換されることが好ましい (IgG2-SKSC)。

これらの置換を行うことにより、IgG2のヒンジ領域に由来するヘテロジェニティーを低減することが可能である。本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域には、上記3種類のアミノ酸置換のうち少なくとも1種類のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域が含まれるが、14番目のCysと102番目のCysが他のアミノ酸に置換されていること、又は上記3種類全てのアミノ酸が置換されていることが好ましい。

[0065] (iii) IgG2定常領域のFc $\gamma$ Rへの結合低減

また本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域の一態様として、配列番号:20に

記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、209番目(EU330)のAlaがSerに、210番目(EU331)のProがSerに、および／または218番目(EU339)のThrがAlaに置換されたIgG2定常領域を提供する。209番目(EU330)のAla、210番目(EU331)のProの置換によりFc $\gamma$ レセプターへの結合を低下させることが可能であることはすでに報告されているが(Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24.)、この改変ではT-cellエпитープになりうる非ヒト由来のペプチドが出現するため、免疫原性リスクの点からは好ましくない。そこで、218番目(EU339)のThrのAlaへの置換を同時に行うことにより、T-cellエпитープになりうる9～12アミノ酸としてはヒト由来のペプチドのみを用いたままIgG2のFc $\gamma$ レセプターへの結合を低下させることが可能である。

本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域は、上述の3箇所のアミノ酸置換のうち少なくとも1箇所のアミノ酸が置換されていればよいが、好ましくは上述の3箇所全てのアミノ酸が置換されていることが好ましい。従って、本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域の好ましい態様として、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、209番目(EU330)のAlaがSerに置換され、210番目(EU331)のProがSerに置換され、かつ218番目(EU339)のThrがAlaに置換されたIgG2定常領域を挙げることができる。

[0066] (iv) IgG2定常領域のC末端ヘテロジェニティーの改善

本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、325番目(EUナンバリングの446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリングの447番目)のLysが欠損したIgG2定常領域を提供する。これらのアミノ酸を両方欠損させることにより、初めて抗体のH鎖C末端に由来するヘテロジェニティーを低減することが可能である。

[0067] (v) IgG2定常領域の改変による薬物動態の向上

また本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域の一態様として、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、147番目(EUナンバリングの268番目)のHis、234番目(EUナンバリングの355番目)のArg、298番目(EUナンバリングの419番目)のGlnを他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域が挙げられる。これらのアミノ酸置換により抗体の薬物動態を向上することが可能である。置換後のア

ミノ酸は特に限定されないが、147番目(EUナンバリング268番目)のHisはGlnに置換されることが好ましく、234番目(EUナンバリングの355番目)のArgはGlnに置換されることが好ましく、298番目(EUナンバリングの419番目)のGlnはGluに置換されることが好ましい。本発明のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域には、上記3種類のアミノ酸置換のうち少なくとも1種類のアミノ酸が置換されたIgG2定常領域が含まれるが、上記3種類全てのアミノ酸が置換されていることが好ましい。

[0068] (vi) IgG4定常領域の酸性での安定性改善

本発明は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列を有するIgG4定常領域において、289番目(EUナンバリング409番目)のArgが他のアミノ酸に置換されたIgG4定常領域を提供する。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Lysへの置換であることが好ましい。配列番号:21に記載のアミノ酸配列において289番目(EUナンバリングの409番目)のArgを他のアミノ酸に置換することにより、抗体の酸性条件化での安定性を向上させることが可能である。

[0069] (vii) IgG4定常領域のC末端ヘテロジェニティーの改善

本発明は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列を有するIgG4定常領域において、326番目(EUナンバリングの446番目)のGlyおよび327番目(EUナンバリングの447番目)のLysが欠損したIgG4定常領域を提供する。これらのアミノ酸を両方欠損させることにより、初めて抗体のH鎖C末端に由来するヘテロジェニティーを低減することが可能である。

[0070] (viii) IgG1定常領域のC末端ヘテロジェニティーの改善

本発明は、配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域において、329番目(EUナンバリングの446番目)のGlyおよび330番目(EUナンバリングの447番目)のLysが欠損したIgG1定常領域を提供する。これらのアミノ酸を両方欠損させることにより、初めて抗体のH鎖C末端に由来するヘテロジェニティーを低減することが可能である。

[0071] (ix)

本発明は、配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域において、317番目(EUナンバリングの434番目)のAsnが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

を有するIgG1定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Alaへの置換が好ましい。

[0072] (x)

本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、209番目(EUナンバリング330番目)のAla、210番目(EUナンバリング331番目)のPro、218番目(EUナンバリング339番目)のThr、276番目(EUナンバリング397番目)のMet、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング219番目)のCys、20番目(EUナンバリング137番目)のGluおよび21番目(EUナンバリング138番目)のSerが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、209番目のAlaはSerに、210番目のProはSerに、218番目のThrはAlaに、276番目のMetはValに、14番目のCysはSerに、16番目のArgはLysに、102番目のCysはSerに、20番目のGluはGlyに、21番目のSerはGlyに置換することが好ましい。

[0073] (xi)

本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、209番目(EUナンバリング330番目)のAla、210番目(EUナンバリング331番目)のPro、218番目(EUナンバリング339番目)のThr、276番目(EUナンバリング397番目)のMet、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング219番目)のCys、20番目(EUナンバリング137番目)のGluおよび21番目(EUナンバリング138番目)のSerが他のアミノ酸に置換され、かつ325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、209番目のAlaはSerに、210番目のProはSerに、218番目のThrはAlaに、276番目のMetはValに、14番目のCysはSerに、16番目のArgはLysに、102番目のCysはSerに、20番目のGluはGlyに、21番目のSerはGlyに置換することが好ましい。

[0074] (xii)



本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、276番目(EUナンバリング397番目)のMet、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング219番目)のCys、20番目(EUナンバリング137番目)のGluおよび21番目(EUナンバリング138番目)のSerが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、276番目のMetはValに、14番目のCysはSerに、16番目のArgはLysに、102番目のCysはSerに、20番目のGluはGlyに、21番目のSerはGlyに置換することが好ましい。

[0075] (xiii)

本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、276番目(EUナンバリング397番目)のMet、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング219番目)のCys、20番目(EUナンバリング137番目)のGluおよび21番目(EUナンバリング138番目)のSerが他のアミノ酸に置換され、かつ325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、276番目のMetはValに、14番目のCysはSerに、16番目のArgはLysに、102番目のCysはSerに、20番目のGluはGlyに、21番目のSerはGlyに置換することが好ましい。

[0076] (xiv)

本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング219番目)のCys、20番目(EUナンバリング137番目)のGlu、21番目(EUナンバリング138番目)のSer、147番目(EUナンバリング268番目)のHis、234番目(EUナンバリング355番目)のArgおよび298番目(EUナンバリング419番目)のGlnが他のアミノ酸に置換され、かつ325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目のCysはSerに、16番目のArgはL

ysに、102番目のCysはSerに、20番目のGluはGlyに、21番目のSerはGlyに、147番目のHisはGlnに、234番目のArgはGlnに、298番目のGlnはGluに置換することが好ましい。

[0077] (xv)

本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列において、14番目(EUナンバリング131番目)のCys、16番目(EUナンバリング133番目)のArg、102番目(EUナンバリング219番目)のCys、20番目(EUナンバリング137番目)のGlu、21番目(EUナンバリング138番目)のSer、147番目(EUナンバリング268番目)のHis、234番目(EUナンバリング355番目)のArg、298番目(EUナンバリング419番目)のGln、および313番目(EUナンバリング434番目)のAsnが他のアミノ酸に置換され、かつ325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目のCysはSerに、16番目のArgはLysに、102番目のCysはSerに、20番目のGluはGlyに、21番目のSerはGlyに、147番目のHisはGlnに、234番目のArgはGlnに、298番目のGlnはGluに、313番目のAsnはAlaに置換されることが好ましい。

[0078] (xvi)

本発明は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、289番目(EUナンバリング409番目)のArg、14番目のCys、16番目のArg、20番目のGlu、21番目のSer、97番目のArg、100番目のSer、102番目のTyr、103番目のGly、104番目のProおよび105番目のPro(EUナンバリング131,133,137,138,214,217,219,220,221,222番目)、113番目のGlu、114番目のPheおよび115番目(EUナンバリング233,234,235番目)のLeuが他のアミノ酸に置換され、かつ116番目(EUナンバリング236番目)のGlyが欠損したアミノ酸配列を有するIgG4定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目(EUナンバリング131)のCysはSerへ、16番目(EUナンバリング133)のArgはLysへ、20番目(EUナンバリング137)のGluはGlyへ、21番目(EUナンバリング138)のSerはGlyへ、97番目(EUナンバリング214)のArgはThrへ、100番目(EUナンバリング217)のSerはArgへ、102番目(E

Uナンバリング219)のTyrはSerへ、103番目(EUナンバリング220)のGlyはCysへ、104番目(EUナンバリング221)のProはValへ、105番目(EUナンバリング222)のProはGluへ、113番目(EUナンバリング233)のGluはProへ、114番目(EUナンバリング234)のPheはValへ、115番目(EUナンバリング235)のLeuはAlaへ、289番目(EUナンバリング409)のArgはLysへの置換が好ましい。

[0079] (xvii)

本発明は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、289番目(EUナンバリング409番目)のArg、14番目のCys、16番目のArg、20番目のGlu、21番目のSer、97番目のArg、100番目のSer、102番目のTyr、103番目のGly、104番目のProおよび105番目のPro(EUナンバリング131,133,137,138,214,217,219,220,221,222番目)、113番目のGlu、114番目のPheおよび115番目のLeu(EUナンバリング233,234,235番目)が他のアミノ酸に置換され、かつ116番目(EUナンバリング236番目)のGly、326番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび327番目(EUナンバリング447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG4定常領域を提供する。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目(EUナンバリング131)のCysはSerへ、16番目(EUナンバリング133)のArgはLysへ、20番目(EUナンバリング137)のGluはGlyへ、21番目(EUナンバリング138)のSerはGlyへ、97番目(EUナンバリング214)のArgはThrへ、100番目(EUナンバリング217)のSerはArgへ、102番目(EUナンバリング219)のTyrはSerへ、103番目(EUナンバリング220)のGlyはCysへ、104番目(EUナンバリング221)のProはValへ、105番目(EUナンバリング222)のProはGluへ、113番目(EUナンバリング233)のGluはProへ、114番目(EUナンバリング234)のPheはValへ、115番目(EUナンバリング235)のLeuはAlaへ、289番目(EUナンバリング409)のArgはLysへの置換が好ましい。

[0080] (xviii)

本発明は、配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域において、317番目(EUナンバリングの434番目)のAsnが他のアミノ酸に置換され、かつ329番目(EUナンバリングの446番目)のGlyおよび330番目(EUナンバリングの447番目)のLysが欠損したアミノ酸配列を有するIgG1定常領域を提供する。

317番目 (EUナンバリングの434番目) のAsnの置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Alaへの置換が好ましい。

[0081] (xix)

さらに本発明はヒンジ領域のヘテロジェニティーが改善され、および／またはFc $\gamma$ レセプターへの結合活性が低減したIgG2の好ましい態様として以下のIgG2を挙げることができる。

配列番号:20に記載のアミノ酸配列からなる定常領域を有するIgG2において、209番目のAla、210番目のPro、218番目のThr、14番目のCys、16番目のArg、102番目のCys、20番目Glu、21番目のSerが他のアミノ酸に置換された抗体。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、209番目 (EUナンバリング330) のAlaをSer、210番目 (EUナンバリング331) のProをSer、218番目 (EUナンバリング339) のThrをAla、14番目 (EUナンバリング131) のCysをSer、16番目 (EUナンバリング133) のArgをLys、102番目 (EUナンバリング219) のCysをSer、20番目 (EUナンバリング137) のGluをGly、21番目 (EUナンバリング138) のSerをGlyに置換することが好ましい。

このようなIgG2定常領域の例として、配列番号:191 (M86) のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を挙げることができる。

又、本発明のIgG2定常領域の他の好ましい態様として、上述のIgG2定常領域において、C末端のヘテロジェニティーを低減させるためにさらに325番目のGlyおよび326番目のLysが欠損したIgG2定常領域を挙げることができる。このような抗体の例として、配列番号:192 (M86  $\Delta$  GK) のアミノ酸配列からなる定常領域を有するIgG2を挙げることができる。

[0082] (xx)

さらに本発明はヒンジ領域のヘテロジェニティーが改善されたIgG2定常領域の好ましい態様として以下のIgG2定常領域を挙げることができる。

配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、14番目のCys、16番目のArg、102番目のCys、20番目のGlu、21番目のSerが他のアミノ酸に置換されたIgG2定常領域。



置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目 (EUナンバリング131) のCysをSer、16番目 (EUナンバリング133) のArgをLys、102番目 (EUナンバリング219) のCysをSer、20番目 (EUナンバリング137) のGluをGly、21番目の (EUナンバリング138) のSerをGlyに置換することが好ましい。

このようなIgG2定常領域の例として、配列番号:193 (M40) のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を挙げることができる。

又、本発明のIgG2定常領域の他の好ましい態様として、上述のIgG2定常領域において、さらに325番目のGlyおよび326番目のLysが欠損したIgG2定常領域を挙げることができる。このような抗体の例として、配列番号:194 (M40 Δ GK) のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域を挙げることができる。

[0083] (xxi) M14 Δ GK、M17 Δ GK、M11 Δ GK、M31 Δ GK、M58、M73、M83、M86 Δ GK、M40 Δ GK

本発明はまた、配列番号:24に記載のアミノ酸配列を有する抗体定常領域 (M14 Δ GK) を提供する。さらに本発明は配列番号:116に記載のアミノ酸配列を有する抗体定常領域 (M17 Δ GK) を提供する。さらに本発明は配列番号:25に記載のアミノ酸配列を有する抗体定常領域 (M11 Δ GK) を提供する。さらに本発明は配列番号:118に記載のアミノ酸配列を有する定常領域 (M31 Δ GK) を提供する。さらに本発明は配列番号:151に記載のアミノ酸配列を有する定常領域 (M58) を提供する。さらに本発明は配列番号:153に記載のアミノ酸配列を有する定常領域を提供する (M73)。さらに本発明は配列番号:164に記載のアミノ酸配列を有する定常領域を提供する (M83)。さらに本発明は配列番号:192に記載のアミノ酸配列を有する定常領域を提供する (M86 Δ GK)。さらに本発明は配列番号:194に記載のアミノ酸配列を有する定常領域を提供する (M40 Δ GK)。これらの抗体定常領域は、Fcγレセプターへの結合活性の低下、免疫原性リスクの低減、酸性条件下での安定性の向上、ヘテロジェニティーの低減、薬物動態の向上および／または、IgG1定常領域と比較した製剤中での高い安定性という性質を有する、最適化された抗体定常領域である。

[0084] 本発明は上記 (i) ～ (xxi) のいずれかに記載の抗体定常領域を含む抗体を提供する。上述の抗体定常領域を有する限り、抗原の種類、抗体の由来などは限定されず

、いかなる抗体でもよい。好ましい抗体の例としては、IL-6レセプターに結合する抗体を挙げることができる。又、他の好ましい抗体の例としてヒト化抗体を挙げることができる。このような抗体の例として、ヒト化PM1抗体の可変領域を有する抗体を挙げることができる。ヒト化PM1抗体の可変領域は上述のアミノ酸置換が行われていてもよいし、その他のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入が行われていてもよい。具体的な置換例としては、上述の(a)～(y)のアフィニティーを向上させる改変、(i)～(viii)の等電点を低下させる改変、( $\alpha$ )～( $\zeta$ )の安定性を向上させる改変、免疫原性を低下させる改変が挙げられるが、これらに限定されることはない。

このような抗体の一態様としては、配列番号:113に記載(PF<sub>1</sub>+M14  $\Delta$  GK)のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号:23に記載(PF1<sub>L</sub>)のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体(PF1)が挙げられるが(軽鎖定常領域はkappaであってもlamdaであってもそれらの改変体であってもよい)、これに限定されない。

また、上述の抗体定常領域および／または上述の抗体定常領域を含む抗体分子は、抗体様結合分子(scaffold分子)、生理活性ペプチド、結合ペプチド等をFc融合分子として結合させることも可能である。

- [0085] 本発明の抗体は、実施例に記載の方法に加えて、例えば以下のようにして取得することも出来る。本発明の抗体を取得する一つの態様においては、まず、当業者に公知の抗IL-6レセプター抗体のCDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域において、1又は複数のアミノ酸残基を、目的の他のアミノ酸に置換する。当業者に公知の抗IL-6レセプター抗体の取得方法に制限はない。CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域において、1又は複数のアミノ酸残基を目的の他のアミノ酸に置換する方法としては、例えば、部位特異的変異誘発法(Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed

d mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz H J(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492) が挙げられる。該方法を用いて、抗体の所望のアミノ酸を目的の他のアミノ酸に置換することができる。他のアミノ酸に置換する方法としては、フレームワークシャッフリング (Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):3049-60) およびCDR repair (US2006/0122377) 等のライブラリー技術を用いることにより、適切なフレームワークおよびCDRにアミノ酸置換することができる。

[0086] 抗体を取得する為の別の態様としては、まず、当業者に周知な方法によって、IL-6 レセプターに結合する抗体を得る。取得された抗体が非ヒト動物抗体であれば、ヒト化することもできる。次いで、取得された抗体が中和活性を有するか否かを当業者に周知な方法によって判定する。抗体の結合活性または中和活性は、例えば実施例に記載の方法で測定することができるが、この方法に限定されない。次いで、抗体の CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基を、目的の他のアミノ酸に置換する。

[0087] より具体的には、本発明は、以下の(a)及び(b)の工程を含む、中和活性が増強された、結合活性が増強した、安定性が向上した、または免疫原性が低下した抗体の製造方法に関する。

(a) CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたH鎖をコードするDNA、及びCDR領域及びFR領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたL鎖をコードするDNAを発現させる工程

(b) 工程(a)の発現産物を回収する工程

[0088] 本発明の製造方法においては、まず、抗IL-6レセプター抗体の変異体のH鎖をコードするDNAであって、CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換され

たH鎖をコードするDNA、および抗IL-6レセプター抗体のL鎖をコードするDNAであって、CDR領域及びFR領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたL鎖をコードするDNAを発現させる。CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたH鎖をコードするDNAは、例えば、野生型のH鎖をコードするDNAのCDR領域、FR領域、又は定常領域部分を取得し、該CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の特定のアミノ酸をコードするコドンが目的の他のアミノ酸をコードするよう、適宜置換を導入することによって得ることが出来る。また、CDR領域及びFR領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたL鎖をコードするDNAは、例えば、野生型のL鎖をコードするDNAのCDR領域及び/又はFR領域を取得し、該CDR領域、FR領域中の特定のアミノ酸をコードするコドンが目的の他のアミノ酸をコードするよう、適宜置換を導入することによって得ることが出来る。

- [0089] また、あらかじめ、野生型H鎖のCDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたタンパク質をコードするDNAを設計し、該DNAを化学的に合成することによって、CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたH鎖をコードするDNAを得ることも可能である。またL鎖についても、野生型L鎖のCDR領域及び/又はFR領域の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたタンパク質をコードするDNAを設計し、該DNAを化学的に合成することによって、CDR領域及び/又はFR領域の1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたL鎖をコードするDNAを得ることも可能である。

アミノ酸置換の種類としては、これに限定されるものではないが、本明細書に記載の置換が挙げられる。

- [0090] また、CDR領域、FR領域、及び定常領域からなる群より選択される少なくとも1つの領域中において、1又は複数のアミノ酸残基が目的の他のアミノ酸に置換されたH鎖



をコードするDNAは、部分DNAに分けて製造することができる。部分DNAの組み合わせとしては、例えば、可変領域をコードするDNAと定常領域をコードするDNA、あるいはFab領域をコードするDNAとFc領域をコードするDNAなどが挙げられるが、これら組み合わせに限定されるものではない。L鎖をコードするDNAもまた、同様に部分DNAに分けて製造することができる。

[0091] 上記DNAを発現させる方法としては、以下の方法が挙げられる。例えば、H鎖可変領域をコードするDNAを、H鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みH鎖発現ベクターを構築する。同様に、L鎖可変領域をコードするDNAを、L鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みL鎖発現ベクターを構築する。これらのH鎖、L鎖の遺伝子を単一のベクターに組み込むことも出来る。発現ベクターとしては例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV(パピローマウイルス)basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

[0092] 以上の方法で作製された抗体発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としてはCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣)等上述の細胞の他にも大腸菌、酵母や枯草菌などの微生物や動植物の個体が用いられる(Nature Biotechnology 25, 563 - 565 (2007)、Nature Biotechnology 16, 773 - 777 (1998)、Biochemical and Biophysical Research Communications 255, 444-450 (1999)、Nature Biotechnology 23, 1159 - 1169 (2005)、Journal of Virology 75, 2803-2809 (2001)、Biochemical and Biophysical Research Communications 308, 94-100 (2003))。また、形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,6077 (1989)、P.L.Felgner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb,Virology 52,456-467(1973))、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

[0093] 抗体の製造においては、次に、工程(a)で得られた発現産物を回収する。発現産物の回収は、例えば、形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液より分離することによって行うことが出来る。抗体の分離、精製には、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、Iq、FcRn、プロテインA、プロテインGカラム、アフィニティー

クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて行うことができる。

なお、本発明の定常領域は、当業者であれば抗体の取得方法に準じて適宜行うことが出来る。

[0094] さらに本発明は、以下の(A)～(X)からなる群より選択される少なくとも1つの工程を含む、抗IL-6レセプター抗体のIL-6レセプターへの結合活性又は中和活性を増強する方法に関する。

(A) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列(HCDR1)において1番目のSerを他のアミノ酸に置換する工程

(B) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列(HCDR1)において5番目のTrpを他のアミノ酸に置換する工程

(C) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において1番目のTyrを他のアミノ酸に置換する工程

(D) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において8番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(E) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において9番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(F) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において1番目のSerを他のアミノ酸に置換する工程

(G) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において2番目のLeuを他のアミノ酸に置換する工程

(H) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において5番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(I) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において7番目のAlaを他のアミノ酸に置換する工程

(J) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において8番目のMetを他のアミノ酸に置換する工程

(K) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において1番目のSerおよび5番目

のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(L) 配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において2番目のLeu、7番目のAlaおよび8番目のMetを他のアミノ酸に置換する工程

(M) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において1番目のArgを他のアミノ酸に置換する工程

(N) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において4番目のGlnを他のアミノ酸に置換する工程

(O) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において9番目のTyrを他のアミノ酸に置換する工程

(P) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において11番目のAsnを他のアミノ酸に置換する工程

(Q) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列(LCDR2)において2番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(R) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において1番目のGlnを他のアミノ酸に置換する工程

(S) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において3番目のGlyを他のアミノ酸に置換する工程

(T) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において9番目のTyrを他のアミノ酸に置換する工程および配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において3番目のGlyを他のアミノ酸に置換する工程

(U) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において5番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(V) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において1番目のGlnおよび5番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(W) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において9番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程および配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)において1番目のSerおよび5番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程

(X) (V)及び(W)に記載の工程。

[0095] 上記(A)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Trp、Thr、またはAsp、Asn、Arg、Val、Phe、Ala、Gln、Tyr、Leu、His、GluまたはCysへの置換が好ましい。

上記(B)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、IleまたはValへの置換が好ましい。

上記(C)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Pheへの置換が好ましい。

上記(D)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Argへの置換が好ましい。

上記(E)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Ser又はAsnへの置換が好ましい。

上記(F)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Ile、Val、ThrまたはLeuへの置換が好ましい。

上記(G)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Thrへの置換が好ましい。

上記(H)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Ala、IleまたはSerへの置換が好ましい。他の好ましい置換としては5番目のThrのSerへの置換が挙げられる。

上記(I)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、SerまたはValへの置換が好ましい。

上記(J)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Leuへの置換が好ましい。

上記(K)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、1番目のSerをLeuに、5番目のThrをAlaに置換することが好ましい。又、他の好ましい置換として、1番目のSerのValへの置換及び5番目のThrのAlaへの置換、1番目のSerのIleへの置換及び5番目のThrのAlaへの置換、1番目のSerのThrへの置換及び5番目のThrのAlaへの置換、1番目のSerのValへの置換及び5番目のThrのIleへの置換、1番目のSerのIleへの置換及び5番目のThrのIleへの置換、1番目のSerの



Thrへの置換及び5番目のThrのIleへの置換、または1番目のSerのLeuへの置換及び5番目のThrのIleへの置換を挙げることができる。

上記(L)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、2番目のLeuをThrに、7番目のAlaをValに、8番目のMetをLeuに置換することが好ましい。

上記(M)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Pheへの置換が好ましい。

上記(N)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、ArgまたはThrへの置換が好ましい。

上記(O)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Pheへの置換が好ましい。

上記(P)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

上記(Q)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Glyへの置換が好ましい。

上記(R)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Gly、AsnまたはSerへの置換が好ましい。

上記(S)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

上記(T)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)のTyrはPheに置換に置換されることが好ましく、配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)のGlyはSerに置換されることが好ましい。

上記(U)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、ArgまたはSerへの置換が好ましい。

上記(V)において、置換後のアミノ酸はアフィニティーが向上する限り特に限定されないが、1番目のGlnをGlyに、5番目のThrをSerに置換することが好ましい。又、他の好ましい置換として1番目のGlnのGlyへの置換及び5番目のThrのArgへの置換を挙

げることができる。

上記(W)において、配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)の9番目のThrはAsnに置換されていることが好ましい。又、配列番号:3に記載のアミノ酸配列(HCDR3)の1番目のSerおよび5番目のThrの置換後のアミノ酸の好ましい組み合わせとして、LeuおよびAla、ValおよびAla、IleおよびAla、ThrおよびAla、ValおよびIle、IleおよびIle、ThrおよびIle、またはLeuおよびIleを挙げることができる。

[0096] 上述の(A)～(X)の工程において、アミノ酸の置換を行う方法は特に限定されないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例に記載の方法によって行うことが出来る。アミノ酸置換が重鎖可変領域に対して行われる場合には置換前の基となる重鎖可変領域のアミノ酸配列はヒト化PM-1の重鎖可変領域のアミノ酸配列であることが好ましく、アミノ酸置換が軽鎖可変領域に対して行われる場合には置換前の基となる軽鎖可変領域のアミノ酸配列はヒト化PM-1の軽鎖可変領域のアミノ酸配列であることが好ましい。又、上述の(A)～(X)の工程に記載のアミノ酸置換はヒト化PM-1抗体に対して行われることが好ましい。

[0097] 本発明の抗IL-6レセプター抗体の結合活性または中和活性を増強する方法は、少なくとも、上述の(A)～(X)のいずれかに記載の工程を含むものであればよい。即ち本発明の方法は、上述の(A)～(X)のいずれかに記載の工程のうち、2以上の工程を含んでもよい。さらに、上述の(A)～(X)のいずれかに記載の工程が含まれる限り、他の工程(例えば、上述の(A)～(X)以外のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入など)が含まれていてもよい。また例えば、FRのアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が行われていてもよいし、定常領域のアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が行われていてもよい。上述のアミノ酸置換はヒト化PM-1抗体に対して行われることが好ましい。

[0098] <抗IL-6レセプター抗体免疫原性リスクを低減させる方法>

また本発明は、配列番号:5に記載のアミノ酸配列(LCDR2)において2番目のThrをGlyに置換する工程を含む、抗IL-6レセプター抗体の免疫原性を低下させる方法に関する。本発明の抗IL-6レセプター抗体の免疫原性を低下させる方法は、配列番号:5に記載のアミノ酸配列(LCDR2)において2番目のThrをGlyに置換する工程を含む

限り、他のアミノ酸置換を含むものであってもよい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

上述のアミノ酸置換はヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体に対して行われることが好ましい。

[0099] <抗IL-6レセプター抗体の等電点を低下させる方法>

また本発明は、以下の(i)～(xv)からなる群より選択される少なくとも1つの工程を含む、抗IL-6レセプター抗体の等電点を低下させる方法に関する。

(i) 配列番号:7に記載のアミノ酸配列(HFR1)において16番目のGlnを他のアミノ酸に置換する工程

(ii) 配列番号:8に記載のアミノ酸配列(HFR2)において8番目のArgを他のアミノ酸に置換する工程

(iii) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列(HFR3)において16番目のArgを他のアミノ酸に置換する工程

(iv) 配列番号:10に記載のアミノ酸配列(HFR4)において3番目のGlnを他のアミノ酸に置換する工程

(v) 配列番号:11に記載のアミノ酸配列(LFR1)において18番目のArgを他のアミノ酸に置換する工程

(vi) 配列番号:12に記載のアミノ酸配列(LFR2)において11番目のLysを他のアミノ酸に置換する工程

(vii) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列(LFR3)において23番目のGlnを他のアミノ酸に置換する工程

(viii) 配列番号:14に記載のアミノ酸配列(LFR4)において10番目のLysを他のアミノ酸に置換する工程

(ix) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列(HCDR1)において1番目のSerを他のアミノ酸に置換する工程

(x) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)において1番目のArgを他のアミノ酸に置換する工程

(xi) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列(LCDR2)において4番目のArgを他のアミノ酸に置換する工程

(xii) 配列番号:7に記載のアミノ酸配列(HFR1)において13番目のArgを他のアミノ酸に置換する工程

(xiii) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HFR1)または配列番号:100に記載のアミノ酸配列において15番目のLysおよび／または16番目のSerを他のアミノ酸に置換する工程

(xiv) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列(LCDR1)または配列番号:101に記載のアミノ酸配列において4番目のGlnを他のアミノ酸に置換する工程

(xv) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列(LCDR2)または配列番号:103に記載のアミノ酸配列において6番目のHisを他のアミノ酸に置換する工程

[0100] 上記(i)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(ii)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(iii)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Lysへの置換が好ましい。

上記(iv)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(v)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

上記(vi)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(vii)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(viii)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(ix)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが



、Aspへの置換が好ましい。

上記(x)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Glnへの置換が好ましい。

上記(xi)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(xii)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Lysへの置換が好ましい。

上記(xiii)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、15番目のLysはGlnへ、16番目のSerはAspへの置換が好ましい。

上記(xiv)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

上記(xv)において、置換後のアミノ酸は等電点が低下する限り特に限定されないが、Gluへの置換が好ましい。

[0101] 上述の(i)～(xv)の工程において、アミノ酸の置換の方法は特に限定されないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例に記載の方法によって行うことが出来る。アミノ酸置換が重鎖可変領域に対して行われる場合には置換前の基となる重鎖可変領域のアミノ酸配列はヒト化PM-1の重鎖可変領域のアミノ酸配列であることが好ましく、アミノ酸置換が軽鎖可変領域に対して行われる場合には置換前の基となる軽鎖可変領域のアミノ酸配列はヒト化PM-1の軽鎖可変領域のアミノ酸配列であることが好ましい。又、上述の(i)～(xv)の工程に記載のアミノ酸置換はヒト化PM-1抗体に対して行われることが好ましい。

本発明の抗IL-6レセプター抗体の等電点を低下する方法は、少なくとも、上述の(i)～(xv)のいずれかに記載の工程を含むものであればよい。即ち本発明の方法は、上述の(i)～(xv)に記載の工程のうち、2以上の工程を含んでもよい。さらに、上述の(i)～(xv)のいずれかに記載の工程が含まれる限り、他の工程(例えば、上述の(i)～(xv)以外のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入など)が含まれていてもよい。また例えば、定常領域のアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が行われていてもよい。

[0102] <抗IL-6レセプター抗体安定性を向上させる方法>

また本発明は、以下の( $\alpha$ )~( $\zeta$ )からなる群より選択される少なくとも1つの工程を含む、抗IL-6レセプター抗体の安定性を増加させる方法に関する。

( $\alpha$ ) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列(HFR3)において4番目のMetを他のアミノ酸に置換する工程。

( $\beta$ ) 配列番号:9に記載のアミノ酸配列(HFR3)において5番目のLeuを他のアミノ酸に置換する工程。

( $\gamma$ ) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において9番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程。

( $\delta$ ) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列(LCDR3)において5番目のThrを他のアミノ酸に置換する工程。

( $\varepsilon$ ) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列(HCDR2)において16番目のSerを他のアミノ酸に置換する工程。

( $\zeta$ ) 配列番号:10に記載のアミノ酸配列(FR4)において5番目のSerを他のアミノ酸に置換する工程。

上記( $\alpha$ )において、置換後のアミノ酸は安定性が増加する限り特に限定されないが、Ileへの置換が好ましい。

上記( $\beta$ )において、置換後のアミノ酸は安定性が増加する限り特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

上記( $\gamma$ )において、置換後のアミノ酸は安定性が増加する限り特に限定されないが、Asnへの置換が好ましい。

上記( $\delta$ )において、置換後のアミノ酸は安定性が増加する限り特に限定されないが、Serへの置換が好ましい。

上記( $\varepsilon$ )において、置換後のアミノ酸は安定性が増加する限り特に限定されないが、Glyへの置換が好ましい。

上記( $\zeta$ )において、置換後のアミノ酸は安定性が増加する限り特に限定されないが、Ileへの置換が好ましい。

[0103] 上述の( $\alpha$ )~( $\zeta$ )の工程において、アミノ酸の置換の方法は特に限定されないが、

例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例に記載の方法によって行うことが出来る。アミノ酸置換が重鎖可変領域に対して行われる場合には置換前の基となる重鎖可変領域のアミノ酸配列はヒト化PM-1の重鎖可変領域のアミノ酸配列であることが好ましく、アミノ酸置換が軽鎖可変領域に対して行われる場合には置換前の基となる軽鎖可変領域のアミノ酸配列はヒト化PM-1の軽鎖可変領域のアミノ酸配列であることが好ましい。又、上述の( $\alpha$ )~( $\zeta$ )のアミノ酸置換はヒト化PM-1抗体に対して行われることが好ましい。

本発明の抗IL-6レセプター抗体の安定性を増加する方法は、少なくとも、上述の( $\alpha$ )~( $\zeta$ )のいずれかに記載の工程を含むものであればよい。即ち本発明の方法は、上述の( $\alpha$ )~( $\zeta$ )に記載の工程のうち、2以上の工程を含んでもよい。さらに、上述の( $\alpha$ )~( $\zeta$ )のいずれかに記載の工程が含まれる限り、他の工程(例えば、上述の( $\alpha$ )~( $\zeta$ )以外のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入など)が含まれていてもよい。また例えば、定常領域のアミノ酸配列の置換、欠失、付加および／または挿入等が行われていてもよい。

[0104] <抗IL-6レセプター抗体の免疫原性を低下させる方法>

さらに本発明は配列番号:7に記載のアミノ酸配列(HFR1)において13番目のArgをLysに、16番目のGlnをGluに、23番目のThrをAlaに、及び／または30番目のThrをSerに置換する工程を含む、抗IL-6レセプター抗体、特にヒト化PM-1抗体の免疫原性を低下させる方法に関する。本発明の抗IL-6レセプター抗体の免疫原性を低下させる方法は、配列番号:7に記載のアミノ酸配列(HFR1)において30番目のThrをSerに置換する工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含むものであってもよい。

さらに本発明は配列番号:90に記載のアミノ酸配列(HFR3)において27番目のAlaをValに置換する工程を含む、抗IL-6レセプター抗体、特にヒト化PM-1抗体の免疫原性を低下させる方法に関する。本発明の抗IL-6レセプター抗体の免疫原性を低下させる方法は、配列番号:90に記載のアミノ酸配列(HFR3)において27番目のAlaをValに置換する工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含むものであってもよい。

アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

さらに本発明は抗IL-6レセプター抗体、特にヒト化PM-1抗体、H53/L28、あるいはPF1抗体のFR3を配列番号:128または配列番号:129のアミノ酸配列を有するFR3とすることにより抗体の免疫原性を低下させる方法に関する。

[0105] <抗体の酸性条件下における安定性を向上させる方法>

また本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列(IgG2)において、276番目(EUナンバリングの397番目)のMetを他のアミノ酸に置換する工程を含む、抗体の酸性条件下における安定性を向上させる方法に関する。本発明の抗体の酸性条件下における安定性を向上させる方法は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列(IgG2)において276番目(EUナンバリングの397番目)のMetを他のアミノ酸に置換する工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含むものであってもよい。置換後のアミノ酸は特に限定されないがValへの置換が好ましい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例に記載の方法によって行うことができる。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

[0106] <IgG2定常領域のヒンジ部分に由来するヘテロジェニティーを改善する方法>

また本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列(IgG2)において、14番目(EUナンバリング131番目)のCysを他のアミノ酸に置換する工程、16番目(EUナンバリングの133番目)のArgを他のアミノ酸に置換する工程、および／または102番目(EUナンバリングの219番目)のCysを他のアミノ酸に置換する工程を含む、抗体のヘテロジェニティーを改善する方法に関する。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目のCysはSerに、16番目のArgはLysに、102番目のCysはSerに置換されることが好ましい。本発明の抗体のヘテロジェニティーを改善する方法は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列(IgG2)において、14番目(EUナンバリング131番目)のCysを置換する工程、16番目(EUナンバリングの133番目)のArgを置換する工程、および／または102番目(EUナンバリングの219番目)のCysを置換する工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含むものであってもよい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではない。



いが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。置換されるアミノ酸は上述の3つのアミノ酸全てが置換されてもよいし、1又は2(例えば14番目と102番目、など)のアミノ酸が置換されてもよい。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

[0107] <IgG2定常領域のC末端アミノ酸欠損に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法>

また本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、325番目(EUナンバリングの446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリングの447番目)のLysを欠損させる工程を含む、抗体のヘテロジェニティーを改善する方法に関する。本発明の抗体のヘテロジェニティーを改善する方法は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、325番目(EUナンバリングの446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリングの447番目)のLysを欠損させる工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含んでもよい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

[0108] <IgG2定常領域のヒト配列を維持したままFc $\gamma$ Rへの結合を低減させる方法>

また本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、209番目(EU330)のAlaをSerに置換する工程、210番目(EU331)のProをSerに置換する工程、および218番目(EU339)のThrをAlaに置換する工程を含む、抗体のFc $\gamma$ Rへの結合を低減させる方法に関する。本発明の抗体のFc $\gamma$ Rへの結合を低減させる方法は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、209番目(EU330)のAlaをSerに置換する工程、210番目(EU331)のProをSerに置換する工程、および218番目(EU339)のThrをAlaに置換する工程を含む限り、他の

アミノ酸置換を含むものであってもよい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

[0109] <IgG2定常領域のアミノ酸を置換することにより薬物動態を向上する方法>

また本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、147番目(EU268)のHis、234番目(EU355)のArg及び／又は298番目(EU419)のGlnを他のアミノ酸に置換する工程を含む、抗体の薬物動態を向上する方法に関する。本発明の薬物動態を向上する方法は、上述の工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含むものであってもよい。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、147番目(EU268)のHisはGlnに、234番目(EU355)のArgはGlnに、298番目(EU419)のGlnはGluに置換されることが好ましい。

また本発明は、配列番号:20又は配列番号:151(M58)のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、313番目(EU434)のAsnを他のアミノ酸に置換する工程を含む、抗体の薬物動態を向上する方法に関する。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Alaへの置換が好ましい。本発明の薬物動態を向上する方法は、上述の工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含むものであってもよい。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

[0110] また本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、下記に記載の工程を含む、IgG2のヒンジ部分に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法、酸性条件下での安定性を向上させる方法、C末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法および／または抗体のFc $\gamma$ Rへの結合を低減させる方法に関する(M14 $\Delta$ GK)。

- (a) 配列番号:20の209番目(EUナンバリング330)のAlaをSerに置換する工程、
- (b) 配列番号:20の210番目(EUナンバリング331)のProをSerに置換する工程、
- (c) 配列番号:20の218番目(EUナンバリング339)のThrをAlaに置換する工程、
- (d) 配列番号:20の276番目(EUナンバリング397)のMetをValに置換する工程、

- (e) 配列番号:20の14番目 (EUナンバリング131) のCysをSerに置換する工程、
- (f) 配列番号:20の16番目 (EUナンバリング133) のArgをLysに置換する工程、
- (g) 配列番号:20の102番目 (EUナンバリング219) のCysをSerに置換する工程、
- (h) 配列番号:20の20番目 (EUナンバリング137) のGluをGlyに置換する工程、
- (i) 配列番号:20の21番目 (EUナンバリング138) のSerをGlyに置換する工程、
- 及び
- (j) 配列番号:20の325番目のGly及び326番目のLys (EUナンバリング446および447) を欠損させる工程。

本発明の方法は、上記工程を含む限り、他のアミノ酸置換や欠損、その他工程を含むものであってもよい。アミノ酸の置換や欠損の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

[0111] また本発明は、配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、下記に記載の工程を含む、IgG2のヒンジ部分に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法、酸性条件下での安定性を向上させる方法、および／またはC末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法に関する(M31 Δ GK)。

- (a) 配列番号:20の276番目 (EUナンバリング397) のMetをValに置換する工程、
- (b) 配列番号:20の14番目 (EUナンバリング131) のCysをSerに置換する工程、
- (c) 配列番号:20の16番目 (EUナンバリング133) のArgをLysに置換する工程、
- (d) 配列番号:20の102番目 (EUナンバリング219) のCysをSerに置換する工程、
- (e) 配列番号:20の20番目 (EUナンバリング137) のGluをGlyに置換する工程、
- (f) 配列番号:20の21番目 (EUナンバリング138) のSerをGlyに置換する工程、
- 及び
- (g) 配列番号:20の325番目のGly及び326番目のLys (EUナンバリング446および447) を欠損させる工程。

[0112] また本発明は配列番号:20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、下記に記載の工程を含む、IgG2のヒンジ部分に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法、薬物動態を向上する方法および／またはC末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法に関する(M58)。

- (a)配列番号:20の14番目(EUナンバリング131番目)のCysをSerに置換する工程、
- (b)配列番号:20の16番目(EUナンバリング133番目)のArgをLysに置換する工程、
- (c)配列番号:20の102番目(EUナンバリング219番目)のCysをSerに置換する工程、
- 、
- (d)配列番号:20の20番目(EUナンバリング137番目)のGluをGlyに置換する工程、
- (e)配列番号:20の21番目(EUナンバリング138番目)のSerをGlyに置換する工程、
- (f)配列番号:20の147番目(EUナンバリング268番目)のHisをGlnに置換する工程、
- 、
- (g)配列番号:20の234番目(EUナンバリング355番目)のArgをGlnに置換する工程、
- 、
- (h)配列番号:20の298番目(EUナンバリング419番目)のGlnをGluに置換する工程、
- 、
- (i)配列番号:20の325番目(EUナンバリング446番目)のGlyおよび326番目(EUナンバリング447番目)のLysを欠損させる工程。

[0113] また本発明は配列番号20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、下記に記載の工程を含む、IgG2のヒンジ部分に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法、薬物動態を向上する方法および／またはC末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法に関する(M73)。

- (a)配列番号:20の14番目(EUナンバリング131番目)のCysをSerに置換する工程、
- (b)配列番号:20の16番目(EUナンバリング133番目)のArgをLysに置換する工程、
- (c)配列番号:20の102番目(EUナンバリング219番目)のCysをSerに置換する工程、
- 、
- (d)配列番号:20の20番目(EUナンバリング137番目)のGluをGlyに置換する工程、
- (e)配列番号:20の21番目(EUナンバリング138番目)のSerをGlyに置換する工程、



- (f) 配列番号: 20の147番目 (EUナンバリング268番目) のHisをGlnに置換する工程、
- (g) 配列番号: 20の234番目 (EUナンバリング355番目) のArgをGlnに置換する工程、
- (h) 配列番号: 20の298番目 (EUナンバリング419番目) のGlnをGluに置換する工程、
- (i) 配列番号: 20の313番目 (EUナンバリング434番目) のAsnをAlaに置換する工程、
- (j) 配列番号: 20の325番目 (EUナンバリング446番目) のGlyおよび326番目 (EUナンバリング447番目) のLysを欠損させる工程。

[0114] また本発明は、配列番号: 20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、下記に記載の工程を含む、IgG2のヒンジ部分に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法、C末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法および／または抗体のFc $\gamma$ Rへの結合を低減させる方法に関する(M86  $\Delta$  GK)。

- (a) 配列番号: 20の209番目 (EUナンバリング330) のAlaを他のアミノ酸に置換する工程、
- (b) 配列番号: 20の210番目 (EUナンバリング331) のProを他のアミノ酸に置換する工程、
- (c) 配列番号: 20の218番目 (EUナンバリング339) のThrを他のアミノ酸に置換する工程、
- (d) 配列番号: 20の14番目 (EUナンバリング131) のCysを他のアミノ酸に置換する工程、
- (e) 配列番号: 20の16番目 (EUナンバリング133) のArgを他のアミノ酸に置換する工程、
- (f) 配列番号: 20の102番目 (EUナンバリング219) のCysを他のアミノ酸に置換する工程、
- (g) 配列番号: 20の20番目 (EUナンバリング137) のGluを他のアミノ酸に置換する工程、

(h) 配列番号: 20の21番目 (EUナンバリング138) のSerを他のアミノ酸に置換する工程、

及び

(i) 配列番号: 20の325番目のGly及び326番目のLys (EUナンバリング446および447) を欠損させる工程。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、209番目 (EUナンバリング330) のAlaをSer、210番目 (EUナンバリング331) のProをSer、218番目 (EUナンバリング339) のThrをAla、14番目 (EUナンバリング131) のCysをSer、16番目 (EUナンバリング133) のArgをLys、102番目 (EUナンバリング219) のCysをSer、20番目 (EUナンバリング137) のGluをGly、21番目 (EUナンバリング138) のSerをGlyに置換することが好ましい。

[0115] さらに本発明は、配列番号: 20に記載のアミノ酸配列を有するIgG2定常領域において、下記に記載の工程を含む、IgG2のヒンジ部分に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法および／またはC末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法に関する(M40 Δ GK)。

(a) 配列番号: 20の14番目 (EUナンバリング131) のCysを他のアミノ酸に置換する工程、

(b) 配列番号: 20の16番目 (EUナンバリング133) のArgを他のアミノ酸に置換する工程、

(c) 配列番号: 20の102番目 (EUナンバリング219) のCysを他のアミノ酸に置換する工程、

(d) 配列番号: 20の20番目 (EUナンバリング137) のGluを他のアミノ酸に置換する工程、

(e) 配列番号: 20の21番目 (EUナンバリング138) のSerを他のアミノ酸に置換する工程、

及び

(f) 配列番号: 20の325番目のGly及び326番目のLys (EUナンバリング446および447) を欠損させる工程。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが、14番目 (EUナンバリング131) のCysをSer、16番目 (EUナンバリング133) のArgをLys、102番目 (EUナンバリング219) のCysをSer、20番目 (EUナンバリング137) のGluをGly、21番目 (EUナンバリング138) のSerをGlyに置換することが好ましい。

- [0116] 本発明の方法は、上記工程を含む限り、他のアミノ酸置換や欠損、その他工程を含むものであってもよい。アミノ酸の置換や欠損の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変 (置換、欠損、挿入) 体であることが好ましい。

- [0117] <IgG4定常領域の酸性条件下における安定性を向上させる方法>

本発明はまた、配列番号:21に記載のアミノ酸配列を有するIgG4定常領域 (Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8.) において、289番目 (EUナンバリング409番目) のArgを他のアミノ酸に置換する工程を含む、抗体の酸性条件下における安定性を向上させる方法に関する。本発明の抗体の酸性条件下における安定性を向上させる方法は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列 (ヒトIgG4定常領域) において289番目 (EUナンバリング409番目) のArgを他のアミノ酸に置換する工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含んでもよい。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Lysへの置換が好ましい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変 (置換、欠損、挿入) 体であることが好ましい。

- [0118] <IgG4定常領域のC末端アミノ酸欠損に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法>

また本発明は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列を有するIgG4定常領域 (Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8.) において、326番目 (EUナンバリングの446番目) の

Glyおよび327番目(EUナンバリングの447番目)のLysを欠損させる工程を含む、抗体のヘテロジェニティーを改善する方法に関する。本発明のヘテロジェニティーを改善する方法は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列を有するIgG4定常領域(Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8.)において、327番目(EUナンバリングの447番目)のLysおよび／または326番目(EUナンバリングの446番目)のGlyを欠損させる工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含んでもよい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

[0119] また本発明は、配列番号:21に記載のアミノ酸配列を有するIgG4定常領域(Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8.)において、下記に記載の工程を含む、IgG4の酸性条件下での安定性を向上させる方法、C末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法、抗体のFc $\gamma$ Rへの結合を低減させる方法に関する(M11 $\Delta$ GK)。

- (a)配列番号:21の14番目(EUナンバリング131)のCysをSerに置換する工程、
- (b)配列番号:21の16番目(EUナンバリング133)のArgをLysに置換する工程、
- (c)配列番号:21の20番目(EUナンバリング137)のGluをGlyに置換する工程、
- (d)配列番号:21の21番目(EUナンバリング138)のSerをGlyに置換する工程、
- (e)配列番号:21の97番目(EUナンバリング214)のArgをThrに置換する工程、
- (f)配列番号:21の100番目(EUナンバリング217)のSerをArgに置換する工程、
- (g)配列番号:21の102番目(EUナンバリング219)のTyrをSerに置換する工程、
- (h)配列番号:21の103番目(EUナンバリング220)のGlyをCysに置換する工程、
- (i)配列番号:21の104番目(EUナンバリング221)のProをValに置換する工程、
- (j)配列番号:21の105番目(EUナンバリング222)のProをGluに置換する工程、
- (k)配列番号:21の113番目(EUナンバリング233)のGluをProに置換する工程、
- (l)配列番号:21の114番目(EUナンバリング234)のPheをValに置換する工程、
- (m)配列番号:21の115番目(EUナンバリング235)のLeuをAlaに置換する工程、



- (n)配列番号:21の116番目(EUナンバリング236)のGlyを欠損する工程、  
(o)配列番号:21の289番目(EUナンバリング409)のArgをLysに置換する工程、及び  
(p)配列番号:21の326番目(EUナンバリング446)のGlyおよび327番目(EUナンバリング447)のLysを欠損させる工程。

本発明の方法は、上記工程を含む限り、他のアミノ酸置換や欠損、その他工程を含むものであってもよい。アミノ酸の置換や欠損の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

[0120] <IgG1定常領域のC末端アミノ酸欠損に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法>

また本発明は、配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域において、329番目(EUナンバリングの446番目)のGlyおよび330番目(EUナンバリングの447番目)のLysを欠損させる工程を含む、抗体のヘテロジェニティーを改善する方法に関する。本発明の抗体のヘテロジェニティーを改善する方法は、配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域において、330番目(EUナンバリングの447番目)のLysおよび329番目(EUナンバリングの446番目)のGlyを欠損させる工程を含む限り、他のアミノ酸置換を含んでもよい。アミノ酸置換の方法は特に限定されるものではないが、例えば上述の部位特異的変異誘発法や実施例の記載の方法によって行うことが出来る。

[0121] <IgG1定常領域のアミノ酸を置換することにより薬物動態を向上する方法>

また本発明は、配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域において、317番目(EU434)のAsnを他のアミノ酸に置換する工程を含む、抗体の薬物動態を向上する方法に関する。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、Alaへの置換が好ましい。本発明の薬物動態を向上する方法は、上述の工程を含む限り、他のアミノ

酸置換を含むものであってもよい。

また本発明は配列番号:19に記載のアミノ酸配列を有するIgG1定常領域において、下記に記載の工程を含む薬物動態を向上する方法及び／又はC末端に由来するヘテロジェニティーを低減させる方法に関する。(M83)

(a)配列番号:19の317番目(EU434)のAsnを他のAlaに置換する工程、

(b)配列番号:19の330番目(EUナンバリングの447番目)のLysおよび329番目(EUナンバリングの446番目)のGlyを欠損させる工程。

対象となる抗体は特に限定されないが、抗ヒトIL-6レセプター抗体であることが好ましく、さらにヒト化PM-1抗体、またはその改変(置換、欠損、挿入)体であることが好ましい。

上述の本発明の定常領域は如何なる抗体由来の変領域とも組み合わせることが可能であるが、好ましくはヒトIL-6レセプターに対する抗体由来の変領域と組み合わせられる。ヒトIL-6レセプターに対する抗体の変領域の例としては、ヒト化PM-1抗体の変領域を挙げることができる。ヒト化PM-1抗体の変領域はアミノ酸置換などが行われていない変領域でもよし、上述のアミノ酸置換などが行われた変領域でもよい。

[0122] 本発明は、本発明の抗体を含む、医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、関節リウマチ等のIL-6が関連する疾患の治療において有用である。

本発明の医薬組成物は、抗体に加えて医薬的に許容し得る担体を導入し、公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

[0123] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-50と併用してもよい。

[0124] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

[0125] 投与は好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

[0126] また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。抗体または抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

[0127] 本明細書で用いられているアミノ酸の3文字表記と1文字表記の対応は以下の通りである。

アラニン:Ala:A

アルギニン:Arg:R

アスパラギン:Asn:N

アスパラギン酸:Asp:D

システイン:Cys:C

グルタミン:Gln:Q

グルタミン酸:Glu:E

グリシン:Gly:G

ヒスチジン:His:H

イソロイシン:Ile:I

ロイシン:Leu:L

リジン:Lys:K

メチオニン:Met:M

フェニルアラニン:Phe:F

プロリン:Pro:P

セリン:Ser:S

スレオニン:Thr:T

トリプトファン:Trp:W

チロシン:Tyr:Y

バリン:Val:V

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0128] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1]アフィニティマチュレーション技術を用いたCDR改変による抗原結合能の向上

### SR344の調製

J.Biochem. 108, 673-676 (1990)で報告されているN末端側1番目から344番目のアミノ酸配列からなる可溶性ヒトIL-6R(以下、SR344)(Yamasakiら、Science 1988;241:825-828 (GenBank # X12830))のCHO細胞定常発現株を作製した。

SR344発現CHO細胞から得られた培養上清から、Blue Sepharose 6 FFカラムクロマトグラフィー、SR344に対する特異抗体を固定したカラムによるアフィニティクロマトグラ



フィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの3つのカラムクロマトグラフィーにより、SR344を精製した。

20 mM トリスー塩酸緩衝液、pH 8.0で平衡化したBlue Sepharose 6 FF column (GEヘルスケアバイオサイエンス)に培養上清をそのまま添加し、同緩衝液で非吸着の画分を完全に洗い流した。この後、カラムは300 mMのKClを含む同緩衝液で洗浄した。さらに、300 mM KCl存在下の同緩衝液中で、0 Mから0.5 MまでのKSCNの直線濃度勾配により、吸着した蛋白を溶出した。KSCNの濃度勾配で溶出した画分を、SR344に特異的な抗体を用いたWestern Blottingで分析し、SR344を含む画分を集めた。

SR344に対する特異抗体を固定したカラムは、あらかじめTBS (Tris-Buffered-Saline)で平衡化しておいた。これに第一工程で得られたSR344画分を、Amicon Ultra-15 (MILLIPORE、分子量カットオフ 10 kDa)による限外ろ過で濃縮し、TBSで2倍希釈してから添加した。TBSでカラムを洗浄後、100 mM グリシンー塩酸緩衝液、pH 2.5で、吸着した蛋白を溶出した。溶出した画分は、1 M Tris、pH 8.1を添加してpHを中性に戻した。得られた画分をSDS-PAGEで分析し、SR344が含まれる画分を集めた。

第二工程で得られた画分は、Amicon Ultra-15 (分子量カットオフ 10 kDa)で濃縮し、PBSで平衡化したSuperdex200カラム (GEヘルスケアバイオサイエンス)に添加した。メインピークとして溶出した画分を、SR344の最終精製品とした。

#### [0129] ヒトgp130発現BaF3細胞株の樹立

IL-6依存増殖性を示す細胞株を得るために、以下に示すとおり、ヒトgp130を発現したBaF3細胞株の樹立を行った。

全長ヒトgp130 cDNA (Hibiら、Cell 1990;63:1149-1157 (GenBank # NM\_002184))をPCRにより増幅し、pCHOI (Hirataら、FEBS Letter 1994;356:244-248)のDHFR遺伝子発現部位を除去し、Zeocin耐性遺伝子発現部位を挿入した発現ベクターpCOS2Zeoにクローニングし、pCOS2Zeo/gp130を構築した。全長ヒトIL-6R cDNAをPCRにより増幅し、pcDNA3.1(+) (Invitrogen)にクローニングし、hIL-6R/pcDNA3.1(+)を構築した。

10  $\mu$ gのpCOS2Zeo/gp130をPBSに懸濁したBaF3細胞 ( $0.8 \times 10^7$  cells)に混合し、Gene Pulser (Bio-Rad)を用いて0.33 kV, 950  $\mu$ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロ

ポーレーション処理により遺伝子導入したBaF3細胞を0.2 ng/mLのmouse interleukin-3 (Peprotech)、10% Fetal Bovine Serum (以下FBS、HyClone)を含むRPMI1640培地 (Invitrogen) で一昼夜培養し、100 ng/mLのhuman interleukin-6 (R&D systems)、100 ng/mLのhuman interleukin-6 soluble receptor (R&D systems)および10% FBSを含むRPMI1640培地を加えて選抜し、ヒトgp130発現BaF3細胞株 (以下、BaF3/gp130) を樹立した。このBaF/gp130は、human interleukin-6 (R&D systems)およびSR344存在下で増殖することから、抗IL-6レセプター抗体の増殖阻害活性 (すなわちIL-6レセプター中和活性) の評価に使用することが可能である。

[0130] CDR改変ライブラリーの構築

まず始めに、ヒト化PM1抗体 (Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6) の scFv 化を行った。VH、VL領域をPCRによって増幅し、リンカー配列GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号:106) をVH、VLの間に持つヒト化PM1 HL scFvを作製した。

作製したヒト化PM1 HL scFv DNAを鋳型にしたPCRにより、各CDRアミノ酸のうちの一つのアミノ酸がXとなるターゲットライブラリー、及びCDR中のHot Spot配列のみをランダム配列にしたライブラリーを作製した。各CDRアミノ酸のうちの一つのアミノ酸がXとなるターゲットライブラリーについては、ライブラリー化したいアミノ酸をNNSとしたプライマーを用いたPCR反応によってライブラリー部分を構築、それ以外の部分を通常のPCRによって作製し、assembly PCR法により連結して構築した。この際、一つのCDRのみがライブラリー化されるようにした (J.Mol.Biol 1996 ; 256 : 77-88参考)。また、Hot Spot配列のみをランダム配列にしたライブラリーについては、Hot Spotアミノ酸全てをNNSとしたプライマーを用いたPCRにより同様に構築した。この際、VHのHot Spotのみがライブラリー化されたライブラリー、VLのHot Spotのみがライブラリー化されたライブラリーを構築した (Nature Biotechnology 1999 June;17:568-572参考)。

これらのライブラリーを用い、J. Immunological Methods 1999 ;231:119-135に習い、ribosome display用ライブラリーを構築した。大腸菌無細胞系in vitro translationを行うために、SDA配列(ribosome binding site)、T7 promoterを5'側に付加し、ribosome display用のリンカーとして3'側にgene3部分配列をSfi Iを用いてligationした。

[0131] Ribosome displayによる高アフィニティーscFvの取得

Nature Biotechnology 2000 Dec ; 18 : 1287-1292 に習い、ribosome displayによるパンニングを行った。調製されたSR344を、NHS-PEO4-Biotin (Pierce)を用いてbiotin化し抗原とした。アフィニティーの高いscFvを効率的に取得するために、JBC 2004 ; 279(18) : 18870-18877を参考にし、off-rate selectionを行った。Biotin化抗原量を1 nM、競合抗原量を1  $\mu$ M、4<sup>th</sup> roundでの競合時間を10 O/Nとした。

[0132] scFvのphagemideへの挿入と抗原結合性、配列解析

4<sup>th</sup> roundで得られたDNA poolを鋳型とし、特異的プライマーを用いてPCRすることによりHL scFvを復元した。Sfi Iで消化し、同様にSfi Iで消化したphagemideベクターpELBG lacIベクターに挿入し、XL1-Blue (stratagene)にtransformした。得られたコロニーを用い、phage ELISAによる抗原結合性評価とHL scFv配列解析を行った。J.Mol. Biol 1992 ; 227 : 381-388に習い、SR344を1  $\mu$ g/mLでcoatingしたプレートを用いたphage-ELISAを行った。SR344への結合性が認められたクローンについて、特異的プライマーを用い、配列解析を行った。

[0133] scFvからのIgG化とIgG発現及び精製

動物細胞発現用ベクターを用いてIgGの発現を行った。変異箇所の濃縮が認められたクローンについて、VH、および、VLをそれぞれPCRによって増幅し、XhoI/NheI消化およびEcoRI消化により動物細胞発現用ベクターに挿入した。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3730xL DNA SequencerまたはABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。

[0134] IgG化した抗体の発現

抗体の発現は以下の方法を用いて行った。ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株 (Invitrogen)を10 % Fetal Bovine Serum (Invitrogen)を含むDMEM培地(Invitrogen)へ懸濁し、 $5 \sim 6 \times 10^5$ 個 /mLの細胞密度で接着細胞用ディッシュ(直径10 cm, CORNING)の各ディッシュへ10 mLずつ蒔きこみCO<sub>2</sub> インキュベーター(37°C、5 % CO<sub>2</sub>)内で一昼夜培養した後に、培地を吸引除去し、CHO-S-SFM-II (Invitrogen)培地6.9 mLを添加した。調製したプラスミドDNA混合液(合計13.8  $\mu$ g)を1  $\mu$ g/mL Polyethylenimine (Polysciences Inc.) 20.7  $\mu$ LとCHO-S-SFMII培地 690  $\mu$ Lと混合して室温10分間

静置したものを各ディッシュの細胞へ投入し、4～5時間、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃にて5 % CO<sub>2</sub>) 内でインキュベートした。その後、CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培地6.9 mLを添加して、3日間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養上清を回収した後、遠心分離 (約2000 g、5分間、室温) して細胞を除去し、さらに0.22 μm フィルター MILLEX (登録商標)-GV (Millipore) を通して滅菌した。該サンプルは使用するまで4℃で保存した。

[0135] IgG化した抗体の精製

得られた培養上清にTBS中に懸濁させた50 μLのrProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) を添加し、4℃で4時間以上転倒混和した。その溶液を0.22 μmのフィルターカップ Ultrafree (登録商標)-MC (Millipore) に移し、TBS 500 μLにて3回洗浄後、rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> 樹脂に100 μLの50 mM 酢酸ナトリウム水溶液、pH 3.3に懸濁して2分間静置したのち、抗体を溶出させた。直ちに、6.7 μLの1.5M Tris-HCl, pH 7.8を加えて中和した。溶出は2回行い、200 μLの精製抗体を得た。抗体を含む溶液2 μLをND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop)、あるいは50 μLを分光光度計DU-600 (BECKMAN) に供し、280 nmでの吸光度を測定した。得られた値から以下の式を用いて抗体濃度を算出した。

$$\text{抗体濃度 (mg/mL)} = \text{吸光度} \times \text{希釈倍率} \div 14.6 \times 10$$

[0136] IgG化したクローンのヒトIL-6レセプター中和活性評価

IL-6/IL-6レセプター依存性増殖を示すBaF3/gp130を用いて、IL-6レセプター中和活性を評価した。BaF3/gp130を10% FBSを含むRPMI1640培地で3回洗浄した後に、 $5 \times 10^4$  cells/mLとなるように60 ng/mLのhuman interleukin-6 (TORAY)、60 ng/mLの組換え可溶性ヒトIL-6レセプター (SR344) および10% FBSを含むRPMI1640培地に懸濁し、96 well-plate (CORNING) の各wellに50 μLずつ分注した。次に、精製した抗体を10% FBSを含むRPMI1640に希釈して、各wellに50 μLずつ混合した。37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、3日間培養し、PBSで2倍に希釈したWST-8試薬 (Cell Counting Kit-8、株式会社同仁化学研究所) を20 μL/wellで加え、直後にSUNRISE CLASSIC (TECAN) を用いて450 nmの吸光度 (参照波長620 nm) を測定した。2時間培養した後に、再度450 nmの吸光度 (参照波長620 nm) を測定し、2時間の吸光度変化を指標にIL-6



レセプター中和活性を評価した。

その結果、ヒト化PM1抗体(野生型:WT)と比較して活性の高い抗体が複数得られた。WTよりも高い活性を示す抗体の変異箇所を図4に示した。例えば図1に示すとおり、RD\_6はWTより100%阻害濃度として約50倍程度高い中和活性を示すことが分かった。

[0137] IgG化したクローンのBiacoreによるアフィニティー解析

活性が野生型よりも高かったものについてBiacore T100 (BIACORE) を用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。センサーチップ上に rec-Protein A (ZYMED) (以下、Protein A)を1800RUから2600RU固定化し、そこに種々の抗体を結合させ、そこに抗原をアナライトとして流し、抗体と抗原の相互作用を測定した。抗原には種々の濃度に調整した recombinant human IL-6R sR(R&D systems)(以下rhIL-6sR)を用いた。測定は全て25℃で行った。測定で得られたセンサーグラムから、カインेटクスパラメーターである結合速度定数  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) を算出し、その値をもとに  $K_D$  (M) を算出した。各パラメーターの算出には Biacore T100 Evaluation Software (BIACORE)を用いた。

その結果、ヒト化PM1抗体(野生型:WT)と比較しアフィニティーの高い抗体が複数得られた。例えば、野生型(WT)とRD\_6のセンサーグラムを図2及び3に示した。カインेटクスパラメーター解析結果より、RD\_6はWTより約50倍高いアフィニティーを示すことが分かった(表1)。他にも数10倍高いアフィニティーを持つ抗体が得られた。WTよりも高いアフィニティーを示す変異箇所を図4に示した。

[表1]

サンプル	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	2. 8E+6	1. 8E-3	6. 5E-10
RD_6	2. 3E+6	2. 8E-5	1. 2E-11

[0138] [実施例2]各CDR改変の組み合わせによる抗原結合能の向上

活性及びアフィニティーが高い変異箇所については、変異箇所の融合を行い、より高活性、高アフィニティーの抗体作製を行った。

改変抗体の作製・発現・精製

選定された箇所について改変抗体を作製するためのアミノ酸改変を行った。具体的には、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法で、作製したH(WT)可変領域(H(WT)、塩基配列番号:107)、および、L(WT)鎖可変領域(L(WT)、塩基配列番号:108)に変異を導入した。目的のヒト化抗体可変領域遺伝子配列であることが確認されたH鎖抗体遺伝子断片挿入プラスミドをXhoIおよびNotIで消化した後に、L鎖抗体遺伝子断片挿入プラスミドをEcoRIで消化した後に、反応液を1 %アガロースゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400 bp)のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30  $\mu$  lで溶出した。その後、動物細胞発現用ベクターに H鎖抗体遺伝子断片を挿入し、目的のH鎖発現ベクターを作製した。また、同様にしてL鎖発現ベクターを作製した。連結反応はRapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics)を用い、大腸菌DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績)を形質転換した。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3730xL DNA SequencerまたはABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。作製した発現ベクターを用いて実施例1に記した方法で発現、精製を行った。

[0139] ヒトIL-6レセプター中和活性評価

精製した抗体の中和活性の評価を実施例1に示す方法で行った。ただし、human interleukin-6 (TORAY)濃度を600 ng/mLにして中和活性の評価を行った。WTと比較して高い活性を示す新規抗体が複数得られ、それらのCDR配列を図5に示した。その中でも高い活性を示した抗体としてH鎖にRDC\_5H、L鎖にRDC\_11Lを用いた抗体(RDC\_23とする)の中和活性を図6に示した。RDC\_23はWTと比較して100%阻害濃度として約100倍高い活性を持つことが明らかになった。H鎖にRDC\_5H、L鎖にRDC\_11Lを用いた抗体であるRDC\_23のみならず、H鎖にRDC\_2H、RDC\_3H、RDC\_4H、RDC\_5H、RDC\_6H、RDC\_7H、RDC\_8H、RDC\_27H、RDC\_28H、RDC\_29H、RDC\_30H、RDC\_32H、L鎖にL(WT)を用いた抗体(それぞれ、RDC\_2、RDC\_3、RDC\_4、RDC\_5、RDC\_6、RDC\_7、RDC\_8、RDC\_27、RDC\_28、RDC\_29、RDC\_30、RDC\_32とする)、および、H鎖にH(WT)、L鎖にRDC\_11Lを用いた抗体(RDC\_11とする)においても中和活性

の向上が確認され、アフィニティマチュレーションで見出された変異箇所を組み合わせることで、より高い中和活性を有する抗体が取得可能であることが明らかとなった。また、これら変異箇所を組み合わせた抗体は中和活性が向上していることから、アフィニティも向上していると考えられた。

[0140] ProteinAを用いたBiacoreによるアフィニティ解析

そこで、中和活性が向上した抗体のうちRDC\_2、RDC\_3、RDC\_4、RDC\_5、RDC\_6、RDC\_7、RDC\_8、RDC\_11、RDC\_23について Biacore T100 (BIACORE) を用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。センサーチップ上にアミンカップリング法で re c-Protein A (ZYMED) を 4400 RU から 5000 RU 固定化し、そこに種々の抗体を結合させ、そこに抗原をアナライトとして流し、抗体と抗原の相互作用を測定した。抗原には種々の濃度に調整した rhIL-6sRを用いた。測定は全て25℃で行った。測定で得られたセンサーグラムから、カインेटクスパラメーターである結合速度定数  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) を算出し、その値をもとに  $K_D$  (M) を算出した。各パラメーターの算出には Biacore T100 Evaluation Software (BIACORE)を用いた。その結果、変異箇所を組み合わせたRDC\_2、RDC\_3、RDC\_4、RDC\_5、RDC\_6、RDC\_7、RDC\_8、RDC\_11、RDC\_23 は同時に測定した 変異箇所が1ヶ所であるRD\_28 よりも小さい  $K_D$  値を有していた (表2)。その中でも高いアフィニティを示したRDC\_23に関して図7にセンサーグラムを示した。

[表2]

サンプル	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
RD_28	9.4E+05	1.1E-04	1.2E-10
RDC_2	1.1E+06	2.5E-05	2.2E-11
RDC_3	1.0E+06	3.7E-05	3.7E-11
RDC_4	1.1E+06	2.9E-05	2.7E-11
RDC_5	1.2E+06	2.8E-05	2.2E-11
RDC_6	1.2E+06	3.5E-05	2.9E-11
RDC_7	1.1E+06	4.2E-05	3.8E-11
RDC_8	1.4E+06	3.6E-05	2.5E-11
RDC_11	1.1E+06	7.0E-05	6.5E-11
RDC_23	1.2E+06	3.1E-05	2.5E-11

このことから、これらの抗体のアフィニティは変異箇所の組み合わせ前の抗体より

も強いと考えられた。中和活性と同様、アフィニティマチュレーションで見出された変異箇所を組み合わせることで、より高いアフィニティを有する抗体が取得可能であることが明らかとなった。WTと比較して高い活性あるいはアフィニティを示す変異体のアミノ酸配列は以下のとおりである(WTからの変異箇所に下線)。

(HCDR2)

配列番号:45 YISYSGITNYNPSLKS

(HCDR3)

配列番号:57 LLARATAMDY

配列番号:58 VLARATAMDY

配列番号:59 ILARATAMDY

配列番号:60 TLARATAMDY

配列番号:61 VLARITAMDY

配列番号:62 ILARITAMDY

配列番号:63 TLARITAMDY

配列番号:64 LLARITAMDY

(LCDR3)

配列番号:79 GQGNRLPYT

すなわち、HCDR2の9番目のアミノ酸がAsnであり、HCDR3の1番目のアミノ酸がLeu、Val、Ile、Thrのいずれかから選択され、HCDR3の5番目のアミノ酸がAla、Ileのいずれかから選択され、LCDR3の1番目のアミノ酸がGlyであり、LCDR3の5番目のアミノ酸がArgである抗体を作製することで、WTよりも中和活性、およびアフィニティが著しく向上した抗IL-6レセプター抗体を作製することが可能である。

[0141] Protein A/Gを用いたBiacoreによるアフィニティ解析

Biacore T100 (BIACORE) を用いて、WTおよびRDC\_23の抗原抗体反応の速度論的解析を行った。センサーチップ上にPurified Recomb Protein A/G (Pierce) (以下、Protein A/G) を固定化し、そこに種々の抗体を結合させ、そこに抗原をアナライトとして流し、抗体と抗原の相互作用を測定した。抗原には種々の濃度に調整したrhIL-6sR (R&D systems)、および、組換え可溶性IL-6レセプター(実施例1において調製した



SR344)を用いた。バキュロウィルス感染昆虫細胞より産生されたrhIL-6sRは糖鎖構造がハイマンノース型であるのに対して、CHO細胞より産生されたSR344は糖鎖構造が複合型糖鎖であり末端にシアル酸が結合していると考えられる。実際のヒト生体内の可溶型IL-6レセプターの糖鎖構造が複合型糖鎖であり末端にシアル酸が結合していると考えられることから、SR344のほうがヒト生体内の可溶型IL-6レセプターの構造に近いと考え、本実験ではrhIL-6sRとSR344の比較試験を実施した。

測定で得られたセンサーグラムから、カインेटクスパラメーターである結合速度定数  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) を算出し、その値をもとに  $K_D$  (M) を算出した。各パラメーターの算出には Biacore T100 Evaluation Software(BIACORE) を用いた。

センサーチップは、アミンカップリング法により Protein A/G をCM5 (BIACORE) に約 3000 RU 固定化することで作製した。作製したセンサーチップを用いて、Protein A/G に結合させた抗体 (WT と RDC\_23) と rhIL-6sR および SR344 の2種類の可溶型IL-6レセプターとの相互作用の速度論的解析を行った。ランニングバッファーには HBS-EP+ を用い、流速は 20  $\mu$  L/min とした。各抗体は Protein A/G に約 100 RU 結合するよう調製した。アナライトとして用いた rhIL-6sR は HBS-EP+ を用いて、0、0.156、0.313、0.625  $\mu$  g/mL に調製し、SR344 は 0、0.0654、0.131、0.261  $\mu$  g/mL に調整した。測定はまず目的の抗体である WT と RDC\_23 をProtein A/G に結合させ、そこへアナライト溶液を 3 分間相互作用させ、その後 HBS-EP+(BIACORE) に切り替え 10 分間解離相を測定した。解離相の測定終了後、10  $\mu$  L の 10 mM glycine-HCl (pH1.5) で洗浄し、センサーチップを再生した。この結合・解離・再生を分析の 1 サイクルとした。実験は全て 37  $^{\circ}$ Cで行った。

WT と RDC\_23 それぞれについてこのサイクルに従って測定を行い、rhIL-6sR および SR344 の2種類の可溶型IL-6レセプターについて得られたセンサーグラムを図8、図9、図10、および、図11に示した。得られたセンサーグラムについて、Biacore 専用のデータ解析ソフトウェアである Biacore T100 Evaluation Softwareを用いて速度論的な解析を行った(表3)。その結果、rhIL-6sRとSR344の比較において、WTおよび RDC\_23ともにSR344を用いたほうが得られるアフィニティーが2～3倍弱くなることが明

らかとなった。RDC\_23はrhIL-6sRとSR344の両方に対して、WTと比較して40～60倍程度アフィニティーが向上しており、アフィニティーマチュレーションにより得られた各CDR改変の組み合わせにより、ヒト生体内の可溶型IL-6レセプターの構造に近いと考えられるSR344に対しても、WTと比較して非常に強いアフィニティーを示すことが明らかとなった。以降の実施例においては、測定は全て37℃において、SR344およびprotein A/Gを用いた抗原抗体反応の速度論的解析を行うこととする。

[表3]

サンプル	アナライト	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	rhIL-6sR	1.3E+6	1.5E-3	1.2E-9
	SR344	4.9E+5	2.0E-3	4.0E-9
RDC_23	rhIL-6sR	1.6E+6	4.5E-5	2.8E-11
	SR344	6.4E+5	4.3E-5	6.7E-11

[0142] [実施例3] CDRおよびフレームワーク改変による薬物動態の向上と免疫原性リスクを低減させたH53/L28の創製

Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6においてヒト化されたマウスPM1抗体(以降Wild type、WTと略、H鎖WTをH(WT)とし、L鎖WTをL(WT)とする)の薬物動態の向上、免疫原性リスクの低減、および安定性の向上を目指して以下のように改変を実施した。薬物動態を向上させるために、WTのH鎖可変領域およびL鎖可変領域配列に等電点を低下させる改変の導入を行った。

[0143] ヒト化PM1抗体の立体構造モデルの作製

はじめにヒト化PM1抗体(H(WT)/L(WT))の可変領域表面に露出するアミノ酸残基を確認するために、MOEソフトウェア(Chemical Computing Group Inc.)を用いて、ホモロジーモデリングによりヒト化されたマウスPM1抗体のFv領域モデルを作製した。

[0144] ヒト化PM1抗体の等電点低下のための改変箇所を選定

作製したモデルの詳細な解析により、等電点を低下させる改変導入箇所としてFR配列においては表面に露出するアミノ酸の中で、H16、H43、H81、H105、L18、L45、L79、L107(Kabatナンバリング、Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)が、CDR配列としてはH31、H64、H65、L24、L27、L53、L55が、活性や安定性を低下させることなく、等電点を低下させることができる候補にな

ると考えられた。

[0145] ヒト化PM1抗体に残存するマウス配列の除去

ヒト化PM1抗体はマウスPM1抗体をヒト化した抗体配列である(Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6)。ヒト化PM1抗体のH鎖は、ヒト抗体可変領域であるNEWのフレームワークにCDRグラフトイングしているが、H鎖のH27、H28、H29、H30、H71は活性保持のためマウス配列をそのまま利用している。免疫原性のリスクを考えるとマウス配列は少なければ少ないほど良いと考えられるため、H27、H28、H29、H30をヒト配列にするための配列を探索した。

[0146] ヒト化PM1抗体の安定性向上を目指した改変箇所の選定

ヒト化PM1抗体(H(WT)/L(WT))の可変領域において、H65のセリンからグリシンへの置換(ターン構造の安定化、HCDR2のコンセンサス配列への改変することで安定化)、H69のメチオニンからイソロイシンへの置換(疎水コア構造を安定化)、および、H70のロイシンからセリンへの置換(表面露出残基を親水化することで安定化)、H58のスレオニンからアスパラギンへの置換(HCDR2のコンセンサス配列への改変することで安定化)、L93のスレオニンからセリンへの置換(表面露出残基を親水化することで安定化)、H107のセリンからイソロイシン( $\beta$ シートの安定化)を行うことで安定性を向上させること可能と考え、これらの改変は安定性を向上させる候補になると考えられた。

[0147] ヒト化PM1抗体のIn silicoで予測されたT-cellエпитープの除去

はじめにヒト化PM1抗体(H(WT)/L(WT))の可変領域をTEPITOPE (Methods. 2004 Dec;34(4):468-75)を用いて解析を行った。その結果、L鎖CDR2に、多くのHLAに結合するT-cellエпитープが存在することが示された。そこで、TEPITOPE解析においてL鎖CDR2の免疫原性リスクを低減させつつ、安定性、結合活性、中和活性を低下させない改変を検討した。その結果、L鎖CDR2のL51のスレオニンをグリシンに置換することで、安定性、結合活性、中和活性を低下させずにHLAに結合するT-cellエпитープを除去できることが明らかとなった。

[0148] 各フレームワーク配列の選定

一般公開されているKabat Database (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) およびIMGT Database (<http://imgt.cines.fr/>)よりヒト抗体アミノ酸配列データを入

手し、構築したデータベースを用いることで、各フレームに分けてホモロジー検索が可能である。ヒトフレームワークの選定にあたり、等電点の低下、残存するマウス配列の除去、安定性の向上の観点から上述した各項目の改変を有するヒトフレームワーク配列をデータベースにて検討を行った。その結果、以下に示すとおり改変抗体H53/L28の各フレームワークを以下の配列にすることで結合活性、中和活性を低下させることなく、上述した項目を満たすことが明らかになった。Sourceはそのヒト配列の由来であり、配列のうち下線部のアミノ酸残基がWTと比較して改変を導入したアミノ酸である。

[表4]

H53	SOURCE	配列
FR1	Germine : IMGT_hVH_4_b	QVQLQESGPGLVKPS <u>ETLS</u> LTCAVSGYSIS
FR2	Blood 1996 88: 4620-4629	WVRQPPGEGLEWIG
FR3	Germine : IMGT_hVH_4_b (太字H71&H89を除く)	RVTIS <u>R</u> DTSKNQFSLK <u>L</u> SSVTAADTA <u>A</u> YYCAR
FR4	J IMMUNOL 142: 4027-4033 (1989)	WGEGILVTVSS

L28	SOURCE	配列
FR1	Immunology. 1988 Aug;64(4):573-9	DIQMTQSPSSLSASVGD <u>S</u> VTITC
FR2	Germine : IMGT_hVk_1D_8	WYQQKPGKAPELLIY
FR3	Germine : IMGT_hVk_6D_41	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLE <u>A</u> EDAATYYC
FR4	J. Exp. Med. 1997 185: 1435-1446	FGQGTKVE <u>E</u>

また、上述のH53のFR3は非ヒト配列が存在しているため、さらに免疫原性リスクを低減することが望ましい。免疫原性リスクを低減する改変として、H89のAlaをValに置換した配列(配列番号:127)にすることが可能と考えられる。さらにH53のFR3のH71のArgは結合活性に重要であるため(Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6)、H71がArgで保存されているヒトVH1サブクラスのFR3配列(配列番号:128)、あるいは、ヒトVH3サブクラスのFR3配列(配列番号:129)を用いることで、H鎖、L鎖ともにフレームワークとしては完全にヒト配列である抗ヒトIL-6レセプター抗体を作製可能であると考えられる。

[0149] 各CDR配列の選定

CDR配列にあたり、第一に結合活性、中和活性を低下させることなく、等電点の低



下、安定性の向上、T-cellエピトープの除去の観点からH53/L28の各CDR配列を以下のように選定した。

[表5]

H53	配 列
CDR1	<u>Q</u> DDHAWS
CDR2	YISYSGITN <u>Y</u> NPSLK <u>G</u>
CDR3	SLARTTAMDY
L28	配 列
CDR1	<u>Q</u> ASQDISSYLN
CDR2	Y <u>G</u> S <u>E</u> LHS
CDR3	QQGNSLPYT

[0150] 改変抗体の発現ベクター作製・発現・精製

改変した抗体の発現ベクター作製・発現・精製は、実施例1に記した方法で行った。ヒト化されたマウスPM1抗体のH(WT)変異導入用ベクター、L(WT)変異導入用ベクターに選定されたフレームワーク配列、CDR配列になるように順次改変を導入した。最終的に得られた定されたフレームワーク配列、CDR配列を有するH53/L28(抗体アミノ酸配列 H53 配列番号:104、L28 配列番号:105)をコードする動物細胞発現用ベクターを用いて、H53/L28の発現・精製を行い、以下の評価に使用した。

[0151] 改変抗体H53/L28の等電点電気泳動による等電点評価

可変領域のアミノ酸改変による全長抗体の等電点の変化について評価するために、WTと改変抗体H53/L28の等電点電気泳動による分析を実施した。等電点電気泳動は以下のとおり行った。Phastsystem Cassette (Amersham Biosciences社製)を用いて以下の膨潤液で30 minほどPhast-Gel Dry IEF (Amersham Biosciences社製)ゲルを膨潤させた。

- ミリQ水 1.5 mL
- Pharmalyte 5-8 for IEF (Amersham Biosciences社製) 50 μL
- Pharmalyte 8-10.5 for IEF (Amersham Biosciences社製) 50 μL

膨潤したゲルを用いてPhastSystem(Amersham Biosciences社製)により以下のプログラムで電気泳動を行った。サンプルはStep 2でゲルに添加した。pIマーカーとして、Calibration Kit for pI(Amersham Biosciences社製)を使用した。

Step 1: 2000 V      2.5 mA      3.5 W      15°C      75 Vh

Step 2: 200 V      2.5 mA      3.5 W      15°C      15 Vh

Step 3: 2000 V      2.5 mA      3.5 W      15°C      410 Vh

泳動後のゲルは20 % TCAで固定した後、Silver staining Kit, protein(Amersham Biosciences社製)を用い、キットに添付されているプロトコールに従い銀染色を行った。染色後、pIマーカーの既知等電点からサンプル(全長抗体)の等電点を算出した。その結果、WTの等電点は約9.3であり、改変抗体H53/L28の等電点は約6.5～6.7であり、WTからアミノ酸置換により等電点を約2.7低下したH53/L28が得られた。また、このH53/L28の可変領域(VH、VL配列)の理論等電点をGENETYX(GENETYX CORPORATION)により計算したところ、理論等電点は4.52であった。WTの理論等電点が9.20であることから、WTからアミノ酸置換により可変領域の理論等電点を約4.7低下したH53/L28が得られた。

[0152] H53/L28のヒトIL-6レセプター中和活性評価

WTとH53/L28を実施例1に示す方法で実施した。結果を図12に示した。その結果、改変抗体H53/L28はWTと比較して、BaF/gp130の中和活性が数倍向上していることが明らかとなった。すなわち、H53/L28はWTと比較して、等電点を低下させつつ、中和活性を向上させることが出来た。

[0153] BiacoreによるH53/L28のヒトIL-6レセプターに対するアフィニティー解析

WTとH53/L28のヒトIL-6レセプターへの親和性評価は、Biacore T100 (BIACORE)を用いて速度論的解析を行った。センサーチップ上にPurified Recomb Protein A/G (Pierce) (以下、Protein A/G)を固定化し、そこに種々の抗体を結合させ、そこに抗原をアナライトとして流し、抗体と抗原の相互作用を測定した。抗原には種々の濃度に調整した組換え可溶型IL-6レセプター(SR344)を用いた。測定条件は実施例2と同じ条件で実施した。

得られたWTとH53/L28のセンサーグラムを図13に示した。Biacore 専用のデータ

解析ソフトウェアである Biacore T100 Evaluation Softwareを用いて速度論的な解析を行った結果を表6に示した。その結果、H53/L28はWTと比較して $K_D$ が6倍程度低下しており、アフィニティーが6倍程度向上していることが見出された。すなわちH53/L28はWTと比較して、等電点を低下させつつ、6倍程度アフィニティーを向上させることが出来た。詳細な検討の結果、affinityの向上に寄与しているアミノ酸変異はL51のスレオニンをグリシンに置換した変異であることが考えられた。すなわち、L51のスレオニンをグリシンに置換することでアフィニティーを向上させることが可能であると考えられた。

[表6]

サンプル	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	4.9E+5	2.0E-3	4.0E-9
H53/L28	7.6E+5	5.2E-4	6.8E-10

[0154] H53/L28のTEPITOPEによるT-cellエピトープ予測

H53/L28のTEPITOPE解析 (Methods. 2004 Dec;34(4):468-75)を実施した。その結果、WTに比べて、HLAに結合する可能性のあるペプチド数が大幅に減少していることが分かり、ヒトにおける免疫原性リスクが低減されたと考えられた。

[0155] [実施例4]H53/L28の血漿中滞留性評価

改変抗体H53/L28の正常マウス血漿中動態評価

等電点を低下させた改変抗体H53/L28の血漿中滞留性を評価するために、WTと改変抗体H53/L28の正常マウスにおける血漿中動態の比較を行った。

WTおよびH53/L28をマウス(C57BL/6J、日本チャールズリバー)に1 mg/kgで静脈内および皮下に単回投与し投与前および投与後15分間、2時間、8時間、1日間、2日間、5日間、7日間、14日間、21日間、28日間で採血を行った。ただし投与後15分間は静脈内投与群のみから採血した。採取した血液は直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存した。

マウス血漿中濃度測定はELISA法にて測定した。まずRecombinant Human IL-6 sR (R&D Systems社製) をEZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (PIERCE社製) を用

いてBiotin化した。このBiotin化human-sIL-6RをReacti-Bind Streptavidin High Binding Capacity (HBC) Coated Plates (PIERCE社製)に分注し、室温で1時間以上静置し human-sIL-6R固相化プレートを作成した。血漿中濃度として3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05  $\mu$ g/mLの検量線試料とマウス血漿測定試料を調製し、human-sIL-6R固相化プレートに分注し室温で1時間静置した。その後Anti-human IgG-AP (SIGMA社製)を反応させ、BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System(Kirkegaard & Perry Laboratories社製)を基質として用い発色反応を行い、マイクロプレートリーダーにて650 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices社製)を用いて算出した。WTおよびH53/L28の静脈内投与後の血漿中濃度推移を図14に、皮下投与後の血漿中濃度推移を図15に示した。

得られた血漿中濃度推移のデータを薬物動態解析ソフトWinNonlin (Pharsight社製)で非モデル依存的解析を行い薬物動態学的パラメーター(AUC、クリアランス(CL)、半減期(T1/2))を算出した。T1/2は最終の3点もしくはWinNonlin が自動設定した最終相の血漿中濃度から算出した。BAは静脈内投与後のAUCに対する皮下投与後のAUCの比から算出した。得られた薬物動態学的パラメーターを表7に示した。

[表7]

	iv		sc		BA %
	CL mL/h/kg	T1/2 day	CL/F mL/h/kg	T1/2 day	
WT	0.177	18.5	0.180	14.7	113
H53/L28	0.102	23.5	0.086	29.7	121

H53/L28の静脈内投与後の血漿中半減期(T1/2)はWTの約1.3倍に延長し、クリアランスが約1.7倍低下した。H53/L28の皮下投与後のT1/2はWTの約2倍に延長し、クリアランスが約2.1倍低下した。このようにWTの等電点を低下させることによって、H53/L28の薬物動態を大幅に向上させることが出来た。

H53/L28は、ヒト化PM-1抗体(WT)と比較して、結合活性、中和活性を向上させ、免疫原性リスクを低減させつつ、薬物動態を大幅に向上させたヒト化抗IL-6レセプター抗体であることから、医薬品として開発する上でH53/L28で適用した改変は極めて



有用であると考えられた。

[0156] [実施例5]PF1抗体の作製

ヒト化PM1抗体の発現ベクターおよび変異導入ベクターの作製

実施例4で作成したH53/L28に実施例2で見出されたRDC\_23のアフィニティーを向上させるH鎖2ヶ所、L鎖2ヶ所、合計4ヶ所のCDRの変異を導入した。H53/L28にRDC\_23の変異を導入したH鎖をPF1\_Hとし、H53/L28にRDC\_23の変異を導入したL鎖をPF1\_Lとし、改変抗体を作製・発現・精製は実施例1に記した方法で実施した。PF1\_Hのアミノ酸配列を配列番号:22に、PF1\_Lのアミノ酸配列を配列番号:23に示す。

[0157] ヒトIL-6レセプター中和活性評価

精製したPF1抗体の中和活性の評価を実施例1に示す方法で行った。ただし、human interleukin-6 (TORAY)濃度を600 ng/mLにして中和活性の評価を行った。WTとPF1の中和活性を図16に示した。PF1はWTと比較して100%阻害濃度として約100～1000倍の活性を持つことが明らかになった。

[0158] Biacoreによる PF1 抗体のヒトIL-6レセプターに対するアフィニティー解析

本測定は実施例2と同様の条件で行った。ランニングバッファーには HBS-EP+ を用い、流速は 20  $\mu$  L/minとした。各抗体は Protein A/G に約 100 RU 結合するよう調製した。アナライトとして用いた SR344 は HBS-EP+ を用いて 0、0.065、0.131、0.261  $\mu$  g/mL に調整した。測定はまず抗体溶液をProtein A/G に結合させ、そこへアナライト溶液を 3 分間相互作用させ、その後 HBS-EP+ に切り替え 10もしくは 15 分間解離相を測定した。解離相の測定終了後、10  $\mu$  L の 10 mM glycine-HCl (pH1.5) で洗浄し、センサーチップを再生した。この結合・解離・再生を分析の 1 サイクルとした。各種抗体についてこのサイクルに従って測定を行った。

得られたPF1のセンサーグラムを図17に示した。得られたセンサーグラムについて、Biacore 専用のデータ解析ソフトウェアである Biacore T100 Evaluation Softwareを用いて速度論的な解析を行った結果をWTとH53/L28の結果と合わせて表8に示した。その結果、PF1のアフィニティーはWTと比較して、約150倍向上していることが明らかとなった。アフィニティーマチュレーションの組み合わせにより得られた高アフィニティーのRDC\_23、および、薬物動態を向上させ且つアフィニティーが向上したH53/L28

を組み合わせたことにより、PF1のアフィニティーは相加効果によりこれらよりも高いものが得られた。

[表8]

サンプル	$k_s$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
WT	4.9E+05	2.0E-03	4.0E-09
RDC_23	6.4E+05	4.3E-05	6.7E-11
H53/L28	7.6E+05	5.2E-04	6.8E-10
PF1	1.3E+06	3.5E-05	2.7E-11

[0159] PF1抗体の示走差査型熱量測定(DSC)による熱安定性評価

PF1抗体の熱安定性の評価を実施するために示走差査型熱量測定(DSC)による熱変性中間温度( $T_m$ 値)の評価を行った。WTとPF1の精製抗体を20mM sodium acetate, 150mM NaCl, pH6.0の溶液に対して透析(EasySEP, TOMY)を行い、約0.1mg/mLのタンパク質濃度で、40℃から100℃まで1℃/minの昇温速度でDSC測定を行った。その結果、WTのFab部分の $T_m$ 値は約94℃であり、PF1のFab部分の $T_m$ 値は91℃であることが分かった。一般的なIgG1タイプの抗体分子のFab部分の $T_m$ 値は約60℃～85℃の範囲にあることから(Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 13;355(3):751-7., Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):3049-60)、得られたPF1抗体の熱安定性は一般的なIgG1分子と比較して極めて高いことが示された。

[0160] PF1抗体の高濃度安定性評価

PF1抗体の高濃度製剤における安定性の評価を行った。WTとPF1の精製抗体を20 mM histidine chloride, 150mM NaCl, pH6.5の溶液に対して透析(EasySEP, TOMY)を行い、その後限外ろ過膜により濃縮し、高濃度安定性試験を行った。条件は以下のとおりである。

抗体: WTおよびPF1

緩衝液: 20mM histidine chloride, 150mM NaCl, pH6.0

濃度: 145mg/mL

保存温度と期間: 25℃-2週、25℃-4週、25℃-7週

会合体評価法: システム Waters Alliance

カラム G3000SWxl(TOSOH)

移動相 50mM sodium phosphate, 300mM KCl, pH7.0

流速・波長 0.5ml/min、220nm

サンプルを1/100に希釈して分析

Initial (製剤調製直後) および各条件で保存後の製剤の会合体含有量を上述のゲルろ過クロマトグラフィー法により評価し、initialから会合体含量の変化量(増加量)について図18に示した。その結果、WTおよびPF1はともに非常に高い安定性を示し、25°C-7週の会合体量増加量はWTで約0.7%程度、PF1で約0.3%であることが分かり、それぞれ25°C-1ヶ月あたりの会合体増加量はそれぞれ約0.4%と約0.17%であり、PF1は特に高濃度において極めて高い安定性を示すことが分かった。WO 2003/039485において、IgGの高濃度製剤としてすでに上市されているDaclizumabの100mg/mL製剤の25°Cにおける安定性データが示されているが、Daclizumabの100mg/mL製剤は25°C-1ヶ月あたりの会合体増加量は約0.3%であり、PF1はDaclizumabと比較しても高濃度における安定性が極めて優れており、医薬品として高濃度の溶液製剤を開発する上では、会合体の増加は大きな課題であるが、PF1抗体は高濃度における会合体の増加が極めて少ないことが示された。

PF1は、WTに対して、抗原結合能の向上、等電点の低下による薬物動態の向上、残存するマウス配列の除去とT-cellエピトープの除去による免疫原性リスクの低減、安定性の向上を目的に改変を加えた分子であるが、実際に100mg/mL以上の高濃度製剤における安定性もWTと比較しても非常に高いことが明らかとなり、このような分子を用いることで安定且つ利便性の高い高濃度皮下投与製剤を提供することが可能である。

[0161] [実施例6] PF1抗体のヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスによるPK/PD試験  
ヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスを用いた体内動態試験

WTおよび実施例5で作成したPF1について、ヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウス(hIL-6R tg マウス、Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23;92(11):4862-6)における体内動態およびヒト可溶性IL-6レセプターのvivoでの中和能を評価した。WTおよびPF1をhIL-6R tgマウスに10mg/kgで静脈内に単回投与し投与前および投与後15分間、2時間、4時間、8時間、1日間、2日間、4日間、7日間で採血を行った。採

取した血液は直ちに4°C、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存した。

マウス血漿中濃度測定はELISA法にて測定した。血漿中濃度として6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1  $\mu$ g/mLの検量線試料を調整した。検量線試料およびマウス血漿測定試料をAnti-human IgG( $\gamma$ -chain specific) F(ab')<sub>2</sub>(Sigma社製)で固相化したイムノプレート(Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp(Nalge nunc International社製))に分注し、室温で1時間静置後、Goat Anti-Human IgG-BIOT(Southern Biotechnology Associates社製)およびStreptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Roche Diagnostics社製)を順次反応させ、BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System(Kirkegaard & Perry Laboratories社製)を基質として用い発色反応を行い、マイクロプレートリーダーにて650 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices社製)を用いて算出した。WTおよびPF1の血漿中濃度推移を図19に示した。PF1の投与4日間後の血漿中濃度はWTと比較して約5倍高い値であったことから、PF1はWTと比較してヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスにおいて薬物動態が向上していることが明らかとなった。

ヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスは、血漿中にヒト可溶性IL-6レセプターを産生することが分かっている。そのため、ヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスに抗ヒトIL-6レセプター抗体を投与することによって、血漿中に存在するヒト可溶性IL-6レセプターの中和効果を評価することが可能である。

WTあるいはPF1の投与によって、ヒト可溶性IL-6レセプターがどの程度中和されているかを評価するために、マウス血漿中の非結合型のヒト可溶性IL-6レセプター濃度の測定を測定した。マウスの血漿6  $\mu$ LをBSAを含有する希釈バッファーで2倍に希釈し、0.22  $\mu$ mのフィルターカップ(Millipore)において乾燥させた適量のrProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)樹脂に添加することで血漿中に存在する全てのIgG型抗体(マウスIgG、抗ヒトIL-6レセプター抗体および抗ヒトIL-6レセプター抗体-ヒト可溶性IL-6レセプター複合体)をproteinAに吸着させた。その後、高速遠心機でスピンドウンし、パス溶液を回収した。パス溶液にはproteinAに結合した抗ヒトIL-6レセプター抗体-ヒト可溶性IL-6レセプター複合体は含まれないため、パス溶液中のヒト可



溶型IL-6レセプター濃度を測定することによって、非結合型の可溶型IL-6レセプター濃度を測定可能である。可溶型IL-6レセプター濃度は、Quantikine Human IL-6 sR (R&D Systems)を使用した。WTおよびPF1投与マウスの4時間後、8時間後、24時間後、48時間後、96時間後、168時間後の非結合型の可溶型IL-6レセプター濃度の測定を添付説明書に従って実施した。

結果を図20に示した。WTおよびPF1を10mg/kgで静脈内に単回投与した4時間後、8時間後まではWTおよびPF1ともに非結合型の可溶型IL-6レセプター濃度は10ng/mL以下であり、ヒト可溶型IL-6レセプターが中和されていることが確認された。しかし、24時間後のWTの非結合型の可溶型IL-6レセプター濃度は500ng/mL程度であったのに対して、PF1の非結合型の可溶型IL-6レセプター濃度は10ng/mL以下であったことから、PF1はWTよりも持続的にヒト可溶型IL-6レセプターが中和していることが見出された。

PF1は、アフィニティーマチュレーションで見出されたRDC\_23と薬物動態等を改善させたH53/L28を組み合わせたものであり、in vivoで長い血漿中滞留性と高い中和活性を発揮することが可能であると考えられた。実際、ヒト可溶型IL-6レセプターを産生するヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスにおいて、PF1は中和効果と血漿中濃度がWTよりも持続することが示された。

PF1は高濃度製剤における安定性および免疫原性リスクにおいてもWT(ヒト化PM-1抗体)よりも優れており、またヒトIL-6レセプタートランスジェニックマウスにおいてもIL-6レセプター中和効果と血漿中滞留性が優れていることから、医薬品として開発する上でPF1で適用した改変は極めて有用であると考えられた。

[0162] [実施例7] IgG2およびIgG4の酸性条件下における安定性の向上

IgG2、IgG4化ヒト化IL-6レセプター抗体発現ベクターの作製・発現

Fc  $\gamma$  レセプターへの結合性を低下させるためにヒト化PM1抗体(Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6)の定常領域はIgG1アイソタイプであるが、定常領域をIgG2に置換した分子(WT-IgG2、配列番号:109)、および、IgG4(Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8.)に置換した分子(WT-IgG4、配列番号:110)を作製した。IgGの発現には動物細胞発現用ベクターを使用した。実施例1で使用しているヒト化PM1抗体(IgG1)

の定常領域部分のNheI/NotI消化とligationにより定常領域をIgG2あるいはIgG4に置換した発現ベクターを構築した。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3730xL DNA SequencerまたはABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。L鎖としてWTを用い、WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4の発現は実施例1に記した方法で実施した。

(1) ヒト化PM1抗体(WT-IgG1)H鎖:配列番号:15(アミノ酸配列)

(2) WT-IgG2H鎖:配列番号:109(アミノ酸配列)

(3) WT-IgG4H鎖:配列番号:110(アミノ酸配列)

[0163] WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4のプロテインA塩酸溶出による精製

得られた培養上清にTBS中に懸濁させた50  $\mu$  LのrProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences)を添加し、4°Cで4時間以上転倒混和した。その溶液を0.22  $\mu$  mのフィルターカップUltrafree(登録商標)-MC (Millipore)に移し、TBS 500  $\mu$  Lにて3回洗浄後、rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> 樹脂に100  $\mu$  Lの10mM HCl, 150mM NaCl, pH 2.0に懸濁して2分間静置したのち、抗体を溶出させた(塩酸溶出法)。直ちに、6.7  $\mu$  Lの1.5M Tris-HCl, pH 7.8を加えて中和した。溶出は2回行い、200  $\mu$  Lの精製抗体を得た。

[0164] 塩酸溶出法により精製したWT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4のゲルろ過クロマトグラフィー分析

塩酸溶出法により得られた精製品の会合体含量を評価するためにゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。

会合体評価法: システム Waters Alliance

カラム G3000SWxl(TOSOH)

移動相 50mM sodium phosphate, 300mM KCl, pH7.0

流速・波長 0.5ml/min、220nm

結果を図21に示した。WT-IgG1の精製後の会合体含量は2%程度であったのに対して、WT-IgG2、および、WT-IgG4の精製後の会合体含量は25%程度であった。このことから、IgG1は塩酸溶出時の酸に対して安定であるが、IgG2およびIgG4は塩

酸溶出時の酸に対して不安定であり変性・会合化が進行したと考えられ、IgG2およびIgG4は、IgG1と比較して酸性条件下における安定性が低いことが明らかとなった。IgG分子の精製においては、プロテインAが多用されるが、IgG分子のプロテインAからの溶出は酸性条件下で行われる。またIgG分子を医薬品として開発する上で必要なウィルス不活化は、一般に酸性条件下において行われる。これらのことから、IgG分子の酸性条件下における安定性は高いほうが望ましいが、IgG2およびIgG4分子は酸性条件下における安定性がIgG1よりも劣ることが分かり、医薬品として開発するには酸性条件下での変性・会合化という課題が存在することが初めて明らかとなった。医薬品として開発するには変性・会合化という課題が解決されることが望ましいと考えられたが、これまでにアミノ酸置換によりこれを解決する方法は報告されていない。

[0165] WT-IgG2、WT-IgG4のCH3ドメイン改変体の作製と評価

IgG2およびIgG4分子は酸性条件下における安定性がIgG1よりも劣ることが示されたため、IgG2およびIgG4分子の酸性条件下での安定性を改善させる改変体を検討した。IgG2およびIgG4分子の定常領域のモデルより、酸性条件下における不安定要因として、CH3ドメインにおけるCH3/CH3界面の不安定性が考えられ、様々な検討を行った結果、IgG2においてはEUナンバリングの397番目のメチオニン、IgG4においてはEUナンバリングの409番目のアルギニンがそれぞれIgG2およびIgG4のCH3/CH3界面を不安定化していると考えられた。そこで、IgG2のEUナンバリングの397番目のメチオニンをバリンに改変した抗体(IgG2-M397V 配列番号:111(アミノ酸配列))、および、IgG4のEUナンバリングの409番目のアルギニンをリジンに改変した抗体(IgG4-R409K 配列番号:112(アミノ酸配列))を作製した。

目的の抗体の発現ベクターの作製・発現・精製は、上述の塩酸溶出の方法を用いて行った。Protein Aからの塩酸溶出法により得られた精製品の会合体含量を評価するためにゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。

会合体評価法: システム Waters Alliance

カラム G3000SWxl(TOSOH)

移動相 50mM sodium phosphate, 300mM KCl, pH7.0

流速・波長 0.5ml/min、220nm

結果を図21に示した。WT-IgG1の精製後の会合体含量は2%程度であったのに対して、WT-IgG2、および、WT-IgG4の精製後の会合体含量は25%程度であった。それに対して、CH3ドメイン改変体であるIgG2-M397V、および、IgG4-R409Kの会合体含量がIgG1と同等レベルの2%程度であった。IgG2のEUナンバリングの397番目のメチオニンをバリンに改変することで、あるいは、IgG4のEUナンバリングの409番目のアルギニンをリジンに改変することで、IgG2抗体およびIgG4抗体の酸性条件下における安定性を向上させることが可能であることが明らかになった。また、実施例5と同様の方法で、WT-IgG2、WT-IgG4、IgG2-M397V、および、IgG4-R409Kの熱変性中間温度を測定した結果、WT-IgG2、WT-IgG4に比べてIgG2-M397V、IgG4-R409Kはそれぞれ改変を導入したCH3ドメインのT<sub>m</sub>値が高いことが分かった。このことから、IgG2-M397V、IgG4-R409KはそれぞれWT-IgG2、WT-IgG4に比べて熱安定性においても優れていることが分かった。

IgG2およびIgG4はプロテインAを用いた精製工程およびウィルス不活化工程において酸性条件下に暴露されることから、同工程における変性・会合化が課題であったが、IgG2及びIgG4の定常領域配列として、IgG2-M397VおよびIgG4-R409Kを使用することによって、その課題を解決することが可能であることが明らかになり、同改変はIgG2及びIgG4抗体を医薬品として開発する上で極めて有用であることが分かった。また、IgG2-M397VおよびIgG4-R409Kは熱安定性にも優れている点からも有用であることが分かった。

[0166] [実施例8] IgG2のジスルフィド結合由来のヘテロジェニティーの改善

WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4のプロテインA酢酸溶出による精製

実施例7で得られた培養上清にTBS中に懸濁させた50  $\mu$  LのrProtein A Sepharose<sup>T</sup><sub>M</sub> Fast Flow (Amersham Biosciences)を添加し、4°Cで4時間以上転倒混和した。その溶液を0.22  $\mu$  mのフィルターカップUltrafree(登録商標)-MC (Millipore)に移し、TBS 500  $\mu$  Lにて3回洗浄後、rProtein A Sepharose<sup>TM</sup>樹脂に100  $\mu$  Lの50 mM 酢酸ナトリウム水溶液、pH 3.3に懸濁して2分間静置したのち、抗体を溶出させた。直ちに、6.7  $\mu$  Lの1.5M Tris-HCl, pH 7.8を加えて中和した。溶出は2回行い、200  $\mu$  Lの精製抗体を得た。



WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4の陽イオン交換クロマトグラフィー(IEC)分析

精製されたWT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4の均一性を評価するために陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析を行った。

IEC評価法: システム Waters Alliance

カラム ProPac WCX-10 (Dionex)

移動相 A : 25mM MES-NaOH, pH6.1

B : 25mM MES-NaOH, 250mM Na-Acetate, pH6.1

流速・波長 0.5ml/min、280nm

グラジエント B : 50%-75% (75min) WT-IgG1分析時

B : 30%-55% (75min) WT-IgG2、WT-IgG4分析時

結果を図22に示した。WT-IgG1、WT-IgG4はイオン交換分析でシングルピークであったが、WT-IgG2は複数のピークが存在していることが分かり、IgG2分子は、IgG1やIgG4と比較してヘテロジェニティーが多いことが分かった。実際、IgG2のアイソタイプは、ヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティー(不均一性)が報告されており(非特許文献30)、図22に示されたIgG2のヘテロピークもこれに由来する目的物質/関連物質と考えられる。目的物質/関連物質のヘテロジェニティーの製造間差を維持しつつ医薬品として大量に製造することは難しく、医薬品として開発する抗体分子は望ましくは可能な限り均一な(ヘテロジェニティーが少ない)物質であったほうがよい。よって野生型IgG2は、抗体を医薬品として開発するにあたって重要な均一性に課題があると考えられた。実際、US20060194280(A1)において、天然型IgG2はイオン交換クロマトグラフィー分析においてジスルフィド結合に由来する様々なヘテロピークが観察されており、これらのピーク間では生物活性が異なることも報告されている。このヘテロピークを単一化する方法として、US20060194280(A1)においては精製工程におけるリフォールディングが報告されているが、製造においてこれらの工程を用いることはコストがかかり煩雑であるため、好ましくはアミノ酸置換によりヘテロピークを単一化する方法が望ましい。医薬品として開発するにはヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーが解決されることが望ましいと考えられたが、これまでにアミノ酸置換によりこれを解決する方法は報告されていない。

[0167] WT-IgG2のCH1ドメイン、ヒンジ領域の改変体の作製と評価

図23に示すとおりIgG2分子に関しては様々なジスルフィド結合パターンが考えられる。IgG2のヒンジ領域に由来するヘテロジェニティーの原因として、ジスルフィド結合の掛け違い、および、フリーのシステインの存在が考えられた。IgG2はupper hinge領域に2つのシステインを有し(EUナンバリング219番目と220番目、このupper hingeの2つのシステインに隣接するシステインとして、H鎖のCH1ドメインに存在するEUナンバリング131番目のシステインとL鎖のC末端のシステイン、および、2量化する相手H鎖の同じupper hingeの2つのシステインが挙げられる。すなわち、IgG2のupper hinge周辺にはH2L2の会合した状態では合計8個のシステインが隣接しており、これにより、ジスルフィド結合の掛け違い、および、フリーのシステインによる様々なヘテロジェニティーが存在することが考えられる。

IgG2のヒンジ領域に由来するヘテロジェニティーを低減することを目的にIgG2のヒンジ領域配列とCH1ドメインの改変を行った。IgG2においてジスルフィド結合の掛け違い、および、フリーのシステインによるヘテロジェニティーを回避するための検討を行った。各種改変体の検討の結果、野生型IgG2定常領域配列のうち、H鎖のCH1ドメインに存在するEUナンバリング131番目のシステインと133番目のアルギニンをそれぞれセリンとリジンに改変し、H鎖のupper hingeに存在するEUナンバリング219番目のシステインをセリンに改変する(以下、IgG2-SKSC) (IgG2-SKSC:配列番号:120)ことによって、熱安定性を低下させることなくヘテロジェニティーを回避することが可能であると考えられた。これにより、IgG2-SKSCのH鎖とL鎖の共有結合は、EUナンバリング220番目のシステインとL鎖のC末端のシステインでジスルフィド結合により均一に形成されることが考えられる(図24)。

IgG2-SKSCの発現ベクターの作製、発現、精製は実施例1に記した方法で実施した。精製されたIgG2-SKSCおよび野生型IgG2(WT-IgG2)の均一性を評価するために陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析を行った。

IEC評価法:システム Waters Alliance

カラム ProPac WCX-10 (Dionex)

移動相 A : 25mM MES-NaOH, pH5.6

B : 25mM MES-NaOH, 250mM Na-Acetate, pH5.6

流速・波長 0.5ml/min、280nm

グラジエント B : 50%-100% (75min)

結果を図25示した。上述のとおり、WT-IgG2は複数のピークが存在しているが、IgG2-SKSCはシングルピークとして溶出することが分かった。IgG2のヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーは、EUナンバリング220番目のシステインとL鎖のC末端のシステインで単一のジスルフィド結合を形成するようなIgG2-SKSCの改変を導入することで回避できることが示された。また、実施例5と同様の方法で、WT-IgG1、WT-IgG2およびIgG2-SKSCの熱変性中間温度を測定した結果、WT-IgG2はWT-IgG1に比べて低いT<sub>m</sub>値を示すFabドメインのピークが観察されたが、IgG2-SKSCにおいてはそのピークが認められなかった。このことから、IgG2-SKSCはWT-IgG2と比較して熱安定性においても優れていることが分かった。

野生型IgG2は、抗体を医薬品として開発するにあたって重要な均一性に課題があると考えられたが、IgG2-SKSCをIgG2の定常領域配列として使用することにより、この課題を解決することが可能であることが明らかになり、IgG2を医薬品として開発する上で極めて有用であることが分かった。また、IgG2-SKSCは熱安定性にも優れている点からも有用であることが分かった。

[0168] [実施例9]IgG分子のC末端ヘテロジェニティーの改善

WT-IgG1のH鎖C末端ΔGK抗体の発現ベクター構築

抗体のC末端配列のヘテロジェニティーとして、C末端アミノ酸のリジン残基の欠損、および、C末端の2アミノ酸のグリシン、リジンの欠損によるC末端アミノ基のアミド化が報告されており(非特許文献32)、医薬品として開発する上ではこれらのヘテロジェニティーは存在しないことが望ましい。実際、ヒト化PM-1抗体であるTOCILIZUMABにおいても、その主成分は塩基配列上存在するC末端アミノ酸のリジンが翻訳後修飾により欠損した配列であるが、リジンが残存している副成分もヘテロジェニティーとして存在する。そこで、C末端アミノ酸のヘテロジェニティーを低減させることを目的にC末端アミノ酸の改変を行った。具体的には、野生型IgG1のH鎖定常領域のC末端のリジンおよびグリシンを塩基配列上あらかじめ欠損させることで、C末端の2アミノ酸の

グリシン、リジンの欠損によるC末端アミノ基のアミド化を抑制することが可能かどうかを検討した。

実施例1で得たヒト化PM1抗体(WT)のpB-CHベクターを用いてH鎖C末端配列に変異を導入した。QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法でEUナンバリング447番目のLysおよび／またはEUナンバリング446番目のGlyをコードする塩基配列について、これを終止コドンとする変異を導入した。これにより、C末端の1アミノ酸のリジン(EUナンバリング447)をあらかじめ欠損させた抗体、C末端の2アミノ酸のグリシン(EUナンバリング446)、リジン(EUナンバリング447)をあらかじめ欠損させた抗体の発現ベクターを作製した。ヒト化PM1抗体のL鎖と発現させることでH鎖C末端ΔK抗体、および、H鎖C末端ΔGK抗体を得た。発現・精製は実施例1で記した方法で実施した。

精製したH鎖C末端ΔGK抗体の陽イオン交換クロマトグラフィー分析を以下のとおりに行った。精製したH鎖C末端ΔGK抗体を用いて以下の方法で陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析を行い、C末端欠損がヘテロジェニティーに及ぼす影響を評価した。陽イオン交換クロマトグラフィー分析条件は以下のとおりであり、ヒト化PM1抗体、H鎖C末端ΔK抗体、H鎖C末端ΔGK抗体のクロマトグラムを比較した。

カラム:ProPac WCX-10, 4×250 mm (Dionex)

移動相:A: 25 mmol/L MES/NaOH, pH 6.1

B: 25 mmol/L MES/NaOH, 250 mmol/L NaCl, pH 6.1

流速:0.5 mL/min

グラジエント:25 %B(5 min)→(105 min)→67 %B→(1 min)→100 %B (5 min)

検出:280 nm

未改変ヒト化PM-1抗体、H鎖C末端ΔKおよびH鎖C末端ΔGK抗体の分析結果を図26に示す。非特許文献30から、主ピークよりも保持が遅い塩基性ピークにH鎖C末端449番目のLys残存体、447番目のProアミド体が含まれるが、H鎖C末端ΔKでは認められなかった塩基性ピークの大幅な減少がH鎖C末端ΔGK抗体では認めたことから、H鎖C末端の2アミノ酸を欠損させることによって初めてH鎖C末端ヘテロジェニティーを軽減することが可能であると分かった。



H鎖C末端の2残基の欠損の及ぼす熱安定性への影響を評価するために、DSCによるH鎖C末端ΔGK抗体の熱変性温度測定を行った。DSC測定用として150 mM NaClを含む20 mM 酢酸緩衝液、pH6.0に透析することで緩衝液を置換した。ヒト化PM1抗体、H鎖C末端ΔGK抗体およびリファレンス溶液(透析外液)を十分に脱気した後、これらをそれぞれ熱量計セルに封入し40°Cでの熱平衡化を十分に行った。次にDSC走査を40°C～100°Cで約1K/分走査速度で行った。得られた変性ピークについて、非特許文献(Rodolfoら、Immunology Letters、1999年、p47-52)を参考にピークアサインを行ったところ、C末端欠損はCH3ドメインの熱変性温度に影響しないことを確認した。

これにより、H鎖定常領域のC末端のリジンおよびグリシンを塩基配列上あらかじめ欠損させることで、抗体の熱安定性に影響を与えることなく、C末アミノ酸のヘテロジェニティーを低減させることが可能となった。ヒト抗体定常領域IgG1、IgG2、IgG4において、C末端配列はいずれもEUナンバリング447番目がLys、EUナンバリング446番目がGlyになっていることから、本件等で見出されたC末アミノ酸のヘテロジェニティーを低減させる方法はIgG2定常領域とIgG4定常領域、あるいはそれらの改変体にも適用可能であると考えられる。

[0169] [実施例10]新規最適化定常領域M14ΔGK配列の作製

抗原を中和することが目的の抗体医薬においてはFc領域の有するADCC等のエフェクター機能は必要ではなく、従って、Fcγレセプターへの結合は不必要である。免疫原性や副作用の点から考えるとFcγレセプターへの結合は好ましくないと考えられる(非特許文献24, 25)。ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABはIL-6レセプターに特異的に結合し、その生物学的作用を中和することで、関節リウマチ等のIL-6が関連する疾患の治療薬として利用可能であり、Fcγレセプターへの結合は不必要である。

[0170] Fcγレセプター非結合の最適化定常領域M14ΔGKの作製と評価

Fcγレセプターへの結合を低下させる方法としては、IgG抗体のアイソタイプをIgG1からIgG2あるいはIgG4アイソタイプに変える方法が考えられる(Ann Hematol. 1998 Jun;76(6):231-48.)。Fcγレセプターへの結合を完全に無くす方法としては、人工的な

改変をFc領域に導入する方法が報告されている。例えば、抗CD3抗体や抗CD4抗体は抗体のエフェクター機能が副作用を惹起するため、Fc領域のFc $\gamma$ レセプター結合部分に野生型配列には存在しないアミノ酸変異(非特許文献26、27)を導入したFc $\gamma$ レセプター非結合型の抗CD3抗体や抗CD4抗体の臨床試験が行われている(非特許文献24、28)。また、IgG1のFc $\gamma$ R結合部位(EUナンバリング:233、234、235、236、327、330、331番目)をIgG2(EUナンバリング:233、234、235、236)およびIgG4(EUナンバリング:327、330、331番目)の配列にすることでFc $\gamma$ レセプター非結合型抗体を作製することが可能であると報告されている(特許文献6)。しかしながら、IgG1にこれらの変異を全て導入すると、天然には存在しないT-cellエピトープペプチドとなりうる9アミノ酸の新しいペプチド配列が出現し免疫原性のリスクが上昇する。医薬品として開発する上では、免疫原性リスクは極力低いことが望ましい。

上述の課題を解決するために、IgG2の定常領域への改変を検討した。IgG2の定常領域はFc $\gamma$ R結合部位のうちEUナンバリング:233、234、235、236が非結合型であるが、Fc $\gamma$ R結合部位のうちEUナンバリング:327、330、331番目は非結合型のIgG4とは異なる配列であるため、EUナンバリング:327、330、331番目のアミノ酸をIgG4の配列に改変する必要がある(Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24におけるG2 $\Delta$ a)。しかしながら、IgG4はEUナンバリング:339番目のアミノ酸がアラニンであるのに対して、IgG2はスレオニンであるため、EUナンバリング:327、330、331番目のアミノ酸をIgG4の配列に改変しただけでは天然には存在しないT-cellエピトープペプチドとなりうる9アミノ酸の新しいペプチド配列が出現してしまい、免疫原性リスクが上昇するため好ましくない。そこで、上述の改変に加えて新たにIgG2のEUナンバリング:339番目のスレオニンをアラニンに改変することで、新しいペプチド配列の出現を防ぐことが可能であることを見出した。

これらの変異に加えて、実施例7で見出したIgG2の酸性条件下での安定性を向上させるIgG2のEUナンバリングの397番目のメチオニンからバリンへの変異、実施例8で見出されたヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーを改善させるEUナンバリングの131番目のシステインからセリンへの変異、133番目のアルギニンからリジンへの変異、219番目のシステインからセリンへの変異を導入した。さらに1

31番目と133番目の変異導入に伴い天然には存在しないT-cellエピトープペプチドとなりうる9アミノ酸の新しいペプチド配列が出現してしまい免疫原性リスクが生じることから、EUナンバリングの137番目のグルタミン酸からグリシンへの変異、138番目のセリンからグリシンへの変異を導入することで、131番目から139番目付近のペプチド配列を天然に存在するヒト配列と同一のものとした。さらに、C末端に由来するヘテロジェニティーを低減させるためにH鎖C末端のEUナンバリングの446、447番目のグリシンおよびリジンを欠損させた。これらの変異を全て導入した定常領域配列をM14  $\Delta$  GKとした(M14  $\Delta$  GK:配列番号:24)。M14  $\Delta$  GKはT-cellエピトープペプチドとなりうる9アミノ酸の新しいペプチド配列として219番目のシステインからセリンへの変異を導入した1ヶ所が存在するが、システインとセリンはアミノ酸配列としての性質が似ていることから免疫原性のリスクは極めて小さいと考えられ、TEPITOPEによる免疫原性予測においても免疫原性の変化は認められなかった。

可変領域配列としてWTを有し、定常領域配列としてM14  $\Delta$  GKを有するH鎖抗体配列(M14  $\Delta$  GK:配列番号:24、WT-M14  $\Delta$  GK:配列番号:113)の発現ベクターを実施例1に記された方法で作製し、H鎖としてWT-M14  $\Delta$  GK、L鎖としてWTを用いて実施例1に記した方法で発現・精製した。

また、同様の方法で、IgG1定常領域にFc  $\gamma$  レセプターへの結合を低下させるためにEUナンバリング:233、234、235、236、327、330、331、339番目に変異を導入し(Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24におけるG1  $\Delta$  ab)、さらにC末端のヘテロジェニティーを低下させるためにEUナンバリング446番目と447番目を欠損させた(実施例9)WT-M17  $\Delta$  GK(M17  $\Delta$  GK:配列番号:116、WT-M17  $\Delta$  GK:配列番号:115)を作製した。IgG4定常領域にFc  $\gamma$  レセプターへの結合を低下させるためにEUナンバリング:233、234、235、236番目に変異を導入し(Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24におけるG4  $\Delta$  b、この改変においては新しい非ヒト配列が生じるため免疫原性リスクが上昇する)、免疫原性リスクを低減させるために上述の改変に加えてヒンジ領域のジスルフィド結合様式をM14  $\Delta$  GKと同じにするためにEUナンバリング:131、133、137、138、214、217、219、220、221、222番目に変異を導入し、さらに酸性条件下での安定性を向上させるためにEUナンバリング409番目に変異を導入

入し(実施例7)、C末端のヘテロジェニティーを低下させるためにEUナンバリング446番目と447番目を欠損させた(実施例9)WT-M11 $\Delta$ GK(M11 $\Delta$ GK:配列番号:25、WT-M11 $\Delta$ GK:配列番号:114)の発現ベクターを作製した。H鎖としてWT-M17 $\Delta$ GKあるいはWT-M11 $\Delta$ GK、L鎖としてWTを用いて実施例1に記した方法で発現・精製した。

[0171] WT-M14 $\Delta$ GK、WT-M17 $\Delta$ GK、WT-M11 $\Delta$ GKのFc $\gamma$ レセプター結合性の評価

Fc $\gamma$ RIへの結合評価は以下のとおりに行った。Biacore T100 を用いて、センサーチップに固定化したヒト由来 Fc $\gamma$  receptor I (以下、Fc $\gamma$ RI) と、アナライトとして用いたIgG1、IgG2、IgG4、M11 $\Delta$ GK、M14 $\Delta$ GK、M1 $\Delta$ GK 7を相互作用させ、その結合量を比較した。ヒト由来の Fc $\gamma$ RI としては Recombinant Human FcRIA / CD64 (R&D systems) を用い、サンプルとして IgG1、IgG2、IgG4、M11 $\Delta$ GK、M14 $\Delta$ GK、M17 $\Delta$ GK を用いて測定を行った。アミンカップリング法によりセンサーチップ CM5 (BIACORE) に Fc $\gamma$ RIを固定化した。最終的なhFc $\gamma$ RIの固定量は、約13000 RU(resonance units) であった。ランニングバッファーとしてHBS-EP+を用い、流速は20  $\mu$ L/minとした。サンプルをHBS-EP+を用いて100  $\mu$ g/mLの濃度に調整した。分析は、抗体溶液の10  $\mu$ Lをインジェクトする2分間を結合相とし、その後HBS-EP+に切り換え、4分間の解離相とした。解離相終了後、20  $\mu$ Lの5 mM水酸化ナトリウムをインジェクトすることにより、センサーチップを再生した。この結合・解離・再生を分析の1サイクルとし、各種抗体溶液をインジェクトし、センサーグラムを得た。アナライトはそれぞれ IgG4、IgG2、IgG1、M11、M14、M17 の順に流し、それを 2 回繰り返した。測定した結合量データを比較した結果を図27に示した。その結果、結合量は IgG1 > IgG4 >> IgG2 = M11 $\Delta$ GK = M14 $\Delta$ GK = M17 $\Delta$ GK の順に減少しており、野生型のIgG2、M11 $\Delta$ GK、M14 $\Delta$ GK、M17 $\Delta$ GK は野生型のIgG1、IgG4 よりも Fc $\gamma$ RIに対して結合が弱いことが明らかとなった。

Fc $\gamma$ RIIaへの結合評価は以下のとおりに行った。Biacore T100 を用いて、センサーチップに固定化したヒト由来 Fc $\gamma$  receptor IIa (以下、Fc $\gamma$ RIIa) と、アナライトとして用いたIgG1、IgG2、IgG4、M11 $\Delta$ GK、M14 $\Delta$ GK、M17 $\Delta$ GKを相互作用させ、その結合量を比較した。ヒト由来の Fc $\gamma$ RIIa としては Recombinant Human FcRIIA/CD32



a (R&D systems) を用い、サンプルとして IgG1、IgG2、IgG4、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK を用いて測定を行った。アミンカップリング法によりセンサーチップ CM5 (BIACORE) に Fc  $\gamma$  RIIa を固定化した。最終的に約 3300 RU の Fc  $\gamma$  RIIa を固定化した。ランニングバッファーとして HBS-EP+ を用い、流速は 20  $\mu$  L/min とした。その後、ベースラインが安定になるまでランニングバッファーを流し、測定はベースラインが安定してから行った。固定化した Fc  $\gamma$  RIIa に対して、アナライトとして各 IgG アイソタイプ (IgG1, IgG2, IgG4) および変異を導入した抗体 (M11  $\Delta$  GK, M14  $\Delta$  GK, M17  $\Delta$  GK) を相互作用させ、その結合量を観察した。ランニングバッファーには HBS-EP+ を用い、流速は 20  $\mu$  L/min、測定温度は 25°C とした。各 IgG および 改変体は 100  $\mu$  g/mL に調整し、アナライトとして 20  $\mu$  L 流し、固定化した Fc  $\gamma$  RIIa と相互作用させた。相互作用後は 200  $\mu$  L のランニングバッファーを流すことで Fc  $\gamma$  RIIa からアナライトを解離させ、センサーチップを再生させた。アナライトはそれぞれ IgG4、IgG2、IgG1、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK の順に流し、それを 2 回繰り返した。測定した結合量データを比較した結果を図28に示した。その結果、結合量は IgG1 > IgG2 = IgG4 > M11  $\Delta$  GK = M14  $\Delta$  GK = M17  $\Delta$  GK の順に減少しており、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK は野生型の IgG1、IgG2、IgG4 のいずれよりも Fc  $\gamma$  RIIa に対して結合が弱いことが明らかとなった。

Fc  $\gamma$  RIIb への結合評価は以下のとおりに行った。Biacore T100 を用いて、センサーチップに固定化したヒト由来 Fc  $\gamma$  receptor IIb (以下、Fc  $\gamma$  RIIb) と、アナライトとして用いた IgG1、IgG2、IgG4、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK を相互作用させ、その結合量を比較した。ヒト由来の Fc  $\gamma$  RIIb としては Recombinant Human FcRIIB/C (R&D systems) を用い、サンプルとして IgG1、IgG2、IgG4、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK を用いて測定を行った。アミンカップリング法によりセンサーチップ CM5 (BIACORE) に Fc  $\gamma$  RIIb を固定化した。最終的に約 4300 RU の Fc  $\gamma$  RIIb を固定化した。その後、ベースラインが安定になるまでランニングバッファーを流し、測定はベースラインが安定してから行った。固定化した Fc  $\gamma$  RIIb に対して、アナライトとして各 IgG アイソタイプ (IgG1, IgG2, IgG4) および変異を導入した抗体 (M11  $\Delta$  GK, M14  $\Delta$  GK, M17  $\Delta$  GK) を相互作用させ、その結合量を観察した。ランニングバッファーには HBS-

EP+ (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% v/v Surfactant P20)を用い、流速は 20  $\mu$  L/min、測定温度は 25°C とした。各 IgG および 改変体は 200  $\mu$  g/mL に調整し、アナライトとして 20  $\mu$  L 流し、固定化した Fc  $\gamma$  RIIb と相互作用させた。相互作用後は 200  $\mu$  L のランニングバッファーを流すことで Fc  $\gamma$  RIIb からアナライトを解離させ、センサーチップを再生させた。アナライトはそれぞれ IgG4、IgG2、IgG1、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK の順に流し、それを 2 回繰り返した。測定した結合量データを比較した結果を図29に示した。その結果、結合量は IgG4 > IgG1 > IgG2 > M11  $\Delta$  GK = M14  $\Delta$  GK = M17  $\Delta$  GK の順に減少しており、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK は野生型のIgG1、IgG2、IgG4 のいずれよりも Fc  $\gamma$  RIIb に対して結合が弱いことが明らかとなった。

Fc  $\gamma$  RIIIaへの結合評価は以下のとおりに行った。Biacore T100 を用いて、センサーチップに固定化したヒト由来 Fc  $\gamma$  receptor IIIa(以下、Fc  $\gamma$  RIIIa) と、アナライトとして用いたIgG1、IgG2、IgG4、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GKを相互作用させ、その結合量を比較した。ヒト由来の Fc  $\gamma$  RIIIa としてはhFc  $\gamma$  RIIIaV-His6(組み換えhFc  $\gamma$  RIIIaV-His6: 社内調製品)を用い、サンプルとして IgG1、IgG2、IgG4、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK を用いて測定を行った。アミンカップリング法によりセンサーチップ CM5 (BIACORE) に Fc  $\gamma$  RIIIaを固定化した。最終的なhFc  $\gamma$  RIIIaV-His6の固定量は、約8200 RU(resonance units)であった。ランニングバッファーとしてHBS-EP+を用い、流速は5  $\mu$  L/minとした。サンプルを、HBS-EP+を用いて250  $\mu$  g/mLの濃度に調製した。分析は、抗体溶液の10  $\mu$  Lをインジェクトする2分間を結合相とし、その後HBS-EP+に切り換え、4分間の解離相とした。解離相終了後、20  $\mu$  Lの5 mM塩酸をインジェクトすることにより、センサーチップを再生した。この結合・解離・再生を分析の1サイクルとし、各種抗体溶液をインジェクトし、センサーグラムを得た。アナライトはそれぞれ IgG4、IgG2、IgG1、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK の順に流した。測定した結合量データを比較した結果を図30に示した。その結果、結合量は IgG1 >> IgG4 > IgG2 > M17  $\Delta$  GK > M11  $\Delta$  GK = M14  $\Delta$  GK の順に減少しており、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GK、M17  $\Delta$  GK は野生型のIgG1、IgG2、IgG4 よりも Fc  $\gamma$  RIIIa に対して結合が弱いことが明らかとなった。また、Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24に報告さ

れているG1  $\Delta$  abの変異を含むM17  $\Delta$  GKと比較して、M11  $\Delta$  GK、M14  $\Delta$  GKのほうがさらに弱い結合であることが明らかとなった。

以上より、WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GKの各種Fc  $\gamma$  レセプターへの結合は野生型のIgG1と比較して著しく低下していることが確認された。WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GKを定常領域として使用することで、Fc  $\gamma$  レセプターを介したAPCへの取り込みに由来する免疫原性リスクやADCC等のエフェクター機能に由来する副作用を回避することが可能であり、抗原を中和することが目的の抗体医薬の定常領域配列として有用である。

[0172] WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GKの高濃度安定性試験

WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GKの高濃度製剤における安定性の評価を行った。WT-IgG1、WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GKの精製抗体を20mM histidine chloride, 150mM NaCl, pH6.5の溶液に対して透析(EasySEP, TOMY)を行い、その後限外ろ過膜により濃縮し、高濃度安定性試験を行った。条件は以下のとおりである。

抗体: WT-IgG1、WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GK

緩衝液: 20mM histidine chloride, 150mM NaCl, pH6.5

濃度: 61mg/mL

保存温度と期間: 40°C-2W、40°C-1M、40°C-2M

会合体評価法: システム Waters Alliance

カラム G3000SWxl(TOSOH)

移動相 50mM sodium phosphate, 300mM KCl, pH7.0

流速・波長 0.5ml/min、220nm

サンプルを1/100に希釈して分析

Initial(製剤調製直後)および各条件で保存後の製剤の会合体含有量を上述のゲルろ過クロマトグラフィー法により評価し、initialから会合体含量の変化量について図31に示した。その結果、WT-IgG1と比較してWT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GKの会合体増加量は低く、WTの会合体増加量の約1/2であった。また、図32に示すようにFab断片の増加量に関しては、WT-IgG1とWT-M17  $\Delta$  GKは同程度であ

ったが、WT-M14  $\Delta$  GKとWT-M11  $\Delta$  GKはWTのFab断片増加量の約1/4であった。IgGタイプの抗体製剤の劣化経路として、WO 2003/039485に記されているように、会合体の生成とFab分解物の生成が主に挙げられる。WT-M14  $\Delta$  GKとWT-M11  $\Delta$  GKは、WT-IgG1と比較して会合体とFab断片の生成の2つの点で製剤的安定性に優れていることが見出された。これにより、IgG1定常領域では安定性が十分ではなく、医薬品として開発可能な高濃度溶液製剤が作れなかった抗体においても、定常領域としてWT-M14  $\Delta$  GK、WT-M17  $\Delta$  GK、WT-M11  $\Delta$  GKを用いることがより高い安定性を有する高濃度溶液製剤が作製可能になると考えられた。

特にM14  $\Delta$  GKは、本来IgG2分子が有する酸性条件下での不安定性を向上させ、ヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーを改善し、Fc  $\gamma$  レセプターに結合せず、T-cellエピトープペプチドとなりうる9アミノ酸の新しいペプチド配列を最小限に抑え、且つ、高濃度製剤における安定性がIgG1よりも優れた新規な定常領域配列として極めて有用であると考えられた。

[0173] [実施例11] PF1-M14  $\Delta$  GK抗体の作製

実施例5で作製したPF1(定常領域はIgG1)の可変領域部分をXhoI/NheIで切り出し、実施例7で作製したM14  $\Delta$  GK(可変領域はWT)の定常領域部分をNheI/NotIで切り出し、動物細胞発現用ベクターに2つのH鎖抗体遺伝子断片を挿入し、目的のPF1-M14  $\Delta$  GKのH鎖発現ベクターを作製した(PF1\_H-M14  $\Delta$  GK:配列番号:117)。L鎖はPF1\_Lを用い、実施例1で記した方法でPF1-M14  $\Delta$  GK抗体の発現・精製を実施した。

PF1-M14  $\Delta$  GK抗体は、抗IL-6レセプター抗体の医薬品として様々な点でWT(ヒト化PM-1抗体)よりも優れており、極めて有用であると考えられた。

[0174] [実施例12] M31  $\Delta$  GKの作製と評価

実施例10で作製したM14  $\Delta$  GKに対し、EUナンバリング:330、331、339番目をIgG2の配列に改変したM31  $\Delta$  GKを作製した(M31  $\Delta$  GK:配列番号:118)。可変領域配列としてWTを有し、定常領域配列としてM31  $\Delta$  GKを有するH鎖抗体配列(WT-M31  $\Delta$  GK:配列番号:119)の発現ベクターを実施例1に記された方法で作製し、H鎖としてWT-M31  $\Delta$  GK、L鎖としてWTを用いて、WT-M31を実施例1に記した方法で発



現・精製した。

WT-M31に加えて、同時に発現・精製したWT-IgG2およびWT-M14  $\Delta$  GKの陽イオン交換クロマトグラフィー分析を以下のとおりに行った。陽イオン交換クロマトグラフィー分析条件は以下のとおりであり、WT-IgG2、WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M31  $\Delta$  GKのクロマトグラムを比較した。

カラム:ProPac WCX-10, 4×250 mm (Dionex)

移動相:A: 25 mmol/L MES/NaOH, pH 6.1

B: 25 mmol/L MES/NaOH, 250 mmol/L NaCl, pH 6.1

流速:0.5 mL/min

グラジエント:0 %B(5 min)→(65 min)→100 %B→(1 min)

検出:280 nm

WT-IgG2、WT-M14  $\Delta$  GK、WT-M31  $\Delta$  GKの分析結果を図33に示す。WT-IgG2は複数のピークが存在しているが、WT-M31  $\Delta$  GKはWT-M14  $\Delta$  GKと同様シングルピークとして溶出することが分かった。WT-M31  $\Delta$  GKにおいてもIgG2のヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーは回避できることが示された。

#### [0175] [実施例13]完全ヒト化抗体F2H/L39-IgG1の作製

##### PF1抗体のフレームワーク配列の完全ヒト化

実施例5で作製したPF1\_Hには、71番 (Kabatナンバリング、Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)) のアルギニンのみが、マウス配列のまま残存しているため免疫原性の観点からは好ましくない。一般にH鎖の71番目の残基はHCDR2の構造を決める重要な配列であり、実際ヒト化PM1抗体を作製する際にマウスPM1抗体の結合活性に重要であることが報告されており、71番目をアルギニンからバリンに置換すると結合活性が大幅に低下することが明らかになっている(Cancer Research 53, 851-856, 1993)。同様にPF1\_Hはヒト生殖系列遺伝子のVH4ファミリーに分類されるが、VH4ファミリーにおける71番はバリンとして高度に保存されており、71番のアルギニンをバリンに置換すると中和活性の大幅な低下が確認された。

そこで、71番をアルギニン残基のままでマウス配列を完全に除去するため、ヒト生殖

系列遺伝子および報告されているヒト抗体の配列を調査し、71番がアルギニンであり、且つ、抗体の立体構造の維持に重要である残基が保存されている配列を探索した。その結果、表9に示すPF1\_Hとはホモロジーは低いが重要な残基が保存されている候補配列を見出した。

[表9]

Kabat ナンバリング	66688910111213141516171819202122232425262728293031323334353637383940414243444546474849505152535455565758596061626364656667686970717273747576777879808182838485868788899091929394	source
PF1_H	RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAAYYCAR	Germline: IMGT_hvH_4_b (H71&H89を除く)
候補配列	RVTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	Mol. Immunol. 44(4):412-422 (2007)

PF1\_H-IgG1に対し、Kabatナンバリング66番から94番を上記の候補配列に置換することにより、H96-IgG1 (配列番号: 134アミノ酸配列))を設計した。抗体可変領域については、合成オリゴDNAを組み合わせたPCR法(assembly PCR)により作製した。定常領域については、IgG1の発現ベクターからPCR法により増幅した。Assembly PCR法により抗体可変領域と定常領域を結合させ、動物細胞発現用ベクターへ挿入した。H96/PF1L-IgG1の発現、精製を実施例1に記載した方法により行なった。

[0176] フレームワーク完全ヒト化抗体H96/PF1L-IgG1の評価

精製したH96/PF1L-IgG1を用いて、実施例5に記載の方法でT<sub>m</sub>値の測定を行なった。アフィニティーの測定は原則として実施例5と同様の条件で測定を行った。ただし、SR344の濃度は0、0.36、1.4 μg/mLに調整し、また15分間解離相を測定した。その結果、H96/PF1L-IgG1は、PF1-IgG1とほぼ同等のT<sub>m</sub>値およびアフィニティーを示した(表10)。

[表10]

	T <sub>m</sub> (°C)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	KD (M)
PF1 抗体	91.3	1.4E+06	4.2E-05	3.1E-11
H96/PF1L-IgG1	89.8	1.2E+06	4.8E-05	3.9E-11

以上より、PF1抗体のH鎖をH96にすることで、T<sub>m</sub>値およびアフィニティーを維持したままで、PF1抗体に残されていたマウス配列を完全に除去し、PF1抗体のフレームワークを完全ヒト化した抗体が得られた。H96/PF1L-IgG1は、フレームワーク配列にマウス由来配列が存在しないことから、免疫原性の観点で特に優れていると考えられ

た。

[0177] pI低下および免疫原性リスクを低減させたF2H/L39-IgG1の作製

実施例4で示されたとおり、抗体の可変領域のアミノ酸を改変しpIを低下させることで薬物動態を向上できることが明らかとなっている。そこで上記で作製したH96-IgG1に対し、さらに以下のアミノ酸置換を導入した。pIを低下させることを目的に64番のリジンのグルタミンへの置換、および65番のグリシンのアスパラギン酸への置換を導入した。また、免疫原性リスクの低減のため、105番のグルタミン酸のグルタミンへの置換、107番のスレオニンのイソロイシンへの置換を導入した。さらに、実施例2で得られたアフィニティー増強の改変である、95番のバリンのロイシンへの置換、99番のイソロイシンのアラニンへの置換を導入した。これらのアミノ酸置換をH96-IgG1に対して導入したF2H-IgG1(配列番号:135(アミノ酸配列))を実施例1記載の方法で作製した。

またPF1Lに対し以下のアミノ酸置換を導入した。pIを低下させることを目的に27番のグルタミンのグルタミン酸への置換、および55番のロイシンのグルタミン酸への置換を導入した。これらのアミノ酸置換をPF1Lに対して導入したL39(配列番号:136(アミノ酸配列))を実施例1記載の方法で作製した。F2H/L39-IgG1の発現、精製を実施例1に記載した方法により行なった。

[0178] Biacoreによる F2H/L39-IgG1のヒトIL-6レセプターに対するアフィニティー解析

ヒト化PM1抗体(野生型、WT)、PF1抗体(実施例5で作製)、および、F2H/L39-IgG1のアフィニティー測定を行なった。本測定は原則として実施例4と同様の条件で測定を行った。ただし、SR344の濃度は0、0.36、1.4  $\mu$ g/mLに調整し、また15分間解離相を測定した(表11)。

[表11]

サンプル	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
PF1-IgG1	1. 5E+06	4. 4E-05	3. 0E-11
F2H/L39-IgG1	7. 7E+05	4. 0E-05	5. 2E-11

その結果、F2H/L39-IgG1は、KD値としては $10^{-11}$ オーダーを維持しており、極めて強いアフィニティーを有しているが、 $k_a$ がPF1-IgG1と比較して1/2程度に低下している

ことが分かった。

[0179] F2H/L39-IgG1のヒトIL-6レセプター中和活性評価

ヒト化PM1抗体(野生型、WT)、および、F2H/L39-IgG1の中和活性の評価を実施例1に示す方法で行った。但し、human interleukin-6(TORAY)濃度を600 ng/mLにして中和活性の評価を行った。図34に示すとおり、WTと比較してF2H/L39-IgG1は100%阻害濃度として100倍以上の極めて強い活性を持つことが明らかになった。

[0180] F2H/L39-IgG1の等電点電気泳動による等電点評価

F2H/L39-IgG1の等電点を実施例3に記した方法で測定した。F2H/L39-IgG1の等電点は5.5であり、実施例5で作製したPF1抗体と比較してさらに等電点が低下することで薬物動態がさらに改善していると考えられた。

また、このF2H/L39の可変領域(VH、VL配列)の理論等電点をGENETYX(GENETYX CORPORATION)により計算したところ、理論等電点は4.3であった。WTの理論等電点が9.20であることから、WTからアミノ酸置換により可変領域の理論等電点を約4.9低下したF2H/L39が得られた。

[0181] F2H/L39-IgG1のカニクイザルによるPK/PD試験

ヒト化PM1抗体(野生型、WT)、PF1抗体およびF2H/L39-IgG1のカニクイザルにおける薬物動態(PK)および薬効(PD)を評価した。WT、PF1およびF2H/L39-IgG1を1.0 mg/kgで皮下に単回投与し、投与前および経時的に採血した。実施例6と同様に各抗体の血漿中濃度の測定を行った。WT、PF1およびF2H/L39-IgG1の血漿中濃度推移を図35に示した。カニクイザル膜型IL-6レセプターがどの程度中和されているかの薬効を評価するために、抗体投与後3日目(day3)から10日目(day10)までカニクイザルIL-6 5  $\mu$ g/kgを腰背部に連日皮下投与し、24時間後の各個体のCRP濃度を測定した。WTおよびF2H/L39投与時のCRP濃度推移を図36に示した。カニクイザル可溶型IL-6レセプターがどの程度中和されているかの薬効を評価するために、カニクイザル血漿中の非結合型のカニクイザル可溶型IL-6レセプター濃度を測定した。WTおよびF2H/L39投与時の非結合型のカニクイザル可溶型IL-6レセプター濃度推移を図37に示した。

これらの結果から、WTとPF1はほぼ同等の血漿中濃度推移を示したのに対して、よ



りpIを低下させたF2H/L39-IgG1はこれらより抗体血漿中濃度が高く維持された。また、IL-6レセプターに対するアフィニティーが強いF2H/L39-IgG1は、WTと比較してCRP濃度および非結合型のカニクイザル可溶型IL-6レセプター濃度がより低く維持されていることが見出された。

[0182] [実施例14]WT-M14の血漿中滞留性評価

ヒトにおける血漿中滞留性の予測方法

IgG分子の血漿中滞留性が長い(消失が遅い)のは、IgG分子のサルベージレセプターとして知られているFcRnが機能しているためである(Nat Rev Immunol. 2007 Sep; 7(9):715-25)。ピノサイトーシスによってエンドソームに取り込まれたIgG分子は、エンドソーム内の酸性条件下(pH6.0付近)においてエンドソーム内に発現しているFcRnに結合する。FcRnに結合できなかったIgG分子はライソソームへ進みライソソームで分解されるが、FcRnへ結合したIgG分子は細胞表面へ移行し血漿中の中性条件下(pH 7.4付近)においてFcRnから解離することで再び血漿中に戻る。

IgGタイプの抗体として、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4のアイソタイプが知られているが、これらのヒトでの血漿中半減期は、IgG1、IgG2が約36日、IgG3が約29日、IgG4が16日であることが報告されており(Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1369-72.)、IgG1およびIgG2の血漿中滞留性が最も長いと考えられている。一般に抗体医薬のアイソタイプはIgG1、IgG2、IgG4であるが、これらのIgG抗体の薬物動態をさらに向上する方法として、IgGの定常領域の配列を改変することで上述のヒトFcRnへの結合性を向上させる方法が報告されている(J Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1709-17、J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56)。

マウスFcRnとヒトFcRnでは種差が存在することから(Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 5;103(49):18709-14)、定常領域の配列を改変したIgG抗体のヒトにおける血漿中滞留性を予測するためには、ヒトFcRnへの結合評価およびヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて血漿中滞留性を評価することが望ましいと考えられた(Int Immunol. 2006 Dec;18(12):1759-69)。

[0183] ヒトFcRnへの結合評価

FcRnはFcRnと $\beta$  2-microglobulinの複合体である。公開されているヒトFcRn遺伝子

配列(J. Exp. Med. 180 (6), 2377-2381 (1994))を元に、オリゴDNAプライマーを作製した。ヒトcDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)を鋳型とし、作製したプライマーを用いPCR法により遺伝子全長をコードするDNA断片を調整した。得られたDNA断片を鋳型に、PCR法によりシグナル領域を含む細胞外領域(Met1-Leu290)をコードするDNA断片を増幅し、動物細胞発現ベクターへ挿入した(ヒトFcRnアミノ酸配列 配列番号:140)。同様に、公開されているヒト  $\beta$  2-microglobulin遺伝子配列(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002))を元に、オリゴDNAプライマーを作製した。ヒトcDNA(Hu-Placenta Marathon-Ready cDNA, CLONTECH)を鋳型とし、作製したプライマーを用いPCR法により遺伝子全長をコードするDNA断片を調整した。得られたDNA断片を鋳型に、PCR法によりシグナル領域を含む  $\beta$  2-microglobulin全長(Met1-Met119)をコードするDNA断片を増幅し、動物細胞発現ベクターへ挿入した(ヒト  $\beta$  2-microglobulinアミノ酸配列 配列番号:141)。

可溶型ヒトFcRnの発現は以下の手順で行った。調製したヒトFcRnおよびヒト  $\beta$  2-microglobulinのプラスミドを、10 % Fetal Bovine Serum (Invitrogen)を用いたlipofection法により、ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株(Invitrogen)の細胞へ導入した。得られた培養上清を回収した後、IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences)を用い、(J Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80.)の方法に従い精製を行った。その後、Hi Trap Q HP (GE Healthcare)により精製を行った。

ヒトFcRnへの結合評価にはBiacore 3000 を用い、センサーチップに固定化したProtein Lあるいはウサギ抗ヒトIgG Kappa chain抗体へ結合させた抗体に、アナライトとしてヒトFcRnを相互作用させた際のヒトFcRnの結合量よりaffinity(KD)を算出した。具体的には、ランニングバッファーとして150mM NaClを含む50mM Na-phosphate buffer、pH6.0を用い、アミンカップリング法によりセンサーチップ CM5 (BIACORE) にProtein Lあるいはウサギ抗ヒトIgG Kappa chain抗体を固定化した。その後、抗体を0.02% Tween20を含むランニングバッファーで希釈してインジェクトしチップに抗体を結合させた後、ヒトFcRnをインジェクトし、ヒトFcRnの抗体への結合性[0]を評価した。

Affinityの算出にはソフトウェア、BIAevaluationを用いた。得られたセンサーグラムより、ヒトFcRnインジェクト終了直前の抗体へのhFcRn結合量を求め、これをsteady stat

e affinity法でフィッティングしてヒトFcRnに対する抗体のaffinityを算出した。

[0184] ヒト FcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性の評価

ヒト FcRnトランスジェニックマウス(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg line 276 +/- マウス、Jackson Laboratories)における体内動態の評価は以下の通り行った。抗体をマウスに1 mg/kgの投与量で静脈内に単回投与し適時採血を行った。採取した血液は直ちに4 °C、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存した。血漿中濃度はELISA法を用いて測定した。

[0185] WT-M14のヒトにおける血漿中滞留性の予測評価

WT-IgG1とWT-M14のヒトFcRnへの結合性の評価をBIAcoreにより行った結果、表12に示すとおり、WT-M14の結合性のほうが僅かにWT-IgG1よりも優れていた。

[表12]

	KD(μM)
WT-IgG1	2.07
WT-M14	1.85

しかしながら、WT-IgG1とWT-M14のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性の評価を行った結果、図38に示すとおり、WT-IgG1とWT-M14は同等の血漿中滞留性を示したことから、M14の定常領域はヒトにおいてもIgG1の定常領域と同等の血漿中滞留性を示すと考えられた。

[0186] 〔実施例15〕薬物動態を向上させたWT-M44、WT-M58、WT-M73の作製

WT-M58分子の作製

実施例14に示したとおり、WT-M14のヒト FcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性はWT-IgG1と同等であった。薬物動態を向上させる方法として、抗体の等電点を低下させる方法とFcRnへの結合性を増強する方法が知られているが、WT-M14の薬物動態を向上させることを目的に以下の改変を導入した。具体的には、実施例4においてWT-M14から作製したWT-M31 Δ GKのEUナンバリング397番目のバリンをメチオニンに改変し、268番ヒスチジンをグルタミンへ改変し、355番アルギニンをグルタミンへ改変し、419番グルタミンをグルタミン酸へ改変した。これら4箇所の改変をWT-M31 Δ GK に導入し、WT-M58(配列番号:142(アミノ酸配列))を作製

した。発現ベクターの作製は、実施例1の方法で作製し、H鎖としてWT-M58を使用し、L鎖としてL(WT)を用いたWT-M58の発現・精製は実施例1に記載した方法で行った。

[0187] WT-M73分子の作製

一方、IgG1に対して、EUナンバリング:434番目をアラニンに置換したWT-M44(配列番号:143(アミノ酸配列))を作製した。さらにM44に対してH鎖C末端のヘテロジェニティーを低減するために446番目のグリシンおよび447番目のリジンを欠損させたWT-M83(配列番号:185(アミノ酸配列))を作製した。また、WT-M58に対して、EUナンバリング:434番目をアラニンに置換したWT-M73(配列番号:144(アミノ酸配列))を作製した。

これらの発現ベクターの作製は、実施例1の方法で作製し、H鎖としてWT-M44あるいはWT-M58あるいはWT-M73を使用し、L鎖としてL(WT)を用いたWT-M44およびWT-M58およびWT-M73の発現・精製は実施例1に記載した方法で行った。

[0188] WT-M44、WT-M58、WT-M73のヒトにおける血漿中滞留性の予測評価

WT-IgG1、WT-M44、WT-M58およびWT-M73のヒトFcRnへの結合性の評価をBIAcoreにより行った結果、表13に示すとおり、WT-M44、WT-M58およびWT-M73の結合性はWT-IgG1よりもそれぞれ約2.7倍、約1.4倍および約3.8倍程度優れていた。

[表13]

	KD( $\mu$ M)
WT-IgG1	1.62
WT-M44	0.59
WT-M58	1.17
WT-M73	0.42

WT-IgG1、WT-M44、およびWT-M58のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性の評価を行った結果、図39に示すとおり、WT-M58はWT-IgG1およびWT-M44と比較して薬物動態の向上が確認された。さらに、WT-IgG1、WT-M44、WT-M58およびWT-M73のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性の評価を行った結果、図40に示すとおり、WT-M44、WT-M58およびWT-M73はいずれもWT-IgG1と比較して薬物動態の改善が確認され、その薬物動態の改善効果はヒ



トFcRnへの結合能と相関した。なかでもWT-M73に関しては、WT-IgG1と比較して28日後の血漿中濃度が約16倍改善していたことから、ヒトにおいてもM73の定常領域を有する抗体はIgG1の定常領域を有する抗体と比較して大幅に薬物動態が向上すると考えられた。

[0189] [実施例16] 様々な抗体における新規定常領域M14およびM58によるヘテロジェニティー低減効果

実施例8に示すとおり、抗IL-6レセプター抗体であるヒト化PM1抗体(WT)において、定常領域をIgG2からM14に変換することにより、IgG2のヒンジ領域に由来するヘテロジェニティーを低減できることが確認された。そこで、ヒト化PM1抗体以外IgG2タイプの抗体に対しても、定常領域をM14あるいはM58に変換することでヘテロジェニティーを低減できるかどうかを検討した。

ヒト化PM1抗体以外の抗体として、抗IL-6レセプター抗体であるF2H/L39 (F2H/L39\_VHアミノ酸配列 配列番号:145、F2H/L39\_VLアミノ酸配列 配列番号:146)、抗IL-31レセプター抗体であるH0L0 (H0L0\_VHアミノ酸配列 配列番号:147、H0L0\_VLアミノ酸配列 配列番号:148)、抗RANKL抗体であるDNS (DNS\_VHアミノ酸配列 配列番号:149、DNS\_VLアミノ酸配列 配列番号:150)を使用した。それぞれの抗体に対して、定常領域をIgG1 (配列番号:19)、IgG2 (配列番号:20)、および、M14 (配列番号:24)あるいはM58 (配列番号:151)にしたものを作製した。

ヘテロジェニティーの評価方法として、陽イオン交換クロマトグラフィーによる評価を行った。作製した抗体のヘテロジェニティーの評価は、カラムとしてProPac WCX-10 (Dionex)を用い、移動相Aとして20mM Sodium Acetate, pH5.0、移動相Bとして20mM Sodium Acetate, 1M NaCl, pH5.0を使用し、適切な流速およびグラジエントを用いて実施した。陽イオン交換クロマトグラフィー(IEC)による評価を行った結果を図41示した。

図41に示したとおり、抗IL-6レセプター抗体であるヒト化PM1抗体(WT)だけでなく、抗IL-6レセプター抗体であるF2H/L39、抗IL-31レセプター抗体であるH0L0、抗RANKL抗体であるDNSにおいても、定常領域をIgG1からIgG2に変換することでヘテロジェニティーが増大し、定常領域をM14あるいはM58に変換することでいずれの抗体に

においてもヘテロジェニティーを低減できることが確認された。これより、H鎖のCH1ドメインに存在するEUナンバリング131番目のシステインとH鎖のupper hingeに存在するEUナンバリング219番目のシステインをセリンに改変することにより、可変領域の抗体配列および抗原の種類に関わらず、天然型IgG2に由来するヘテロジェニティーを低減できることが示された。

[0190] [実施例17] 様々な抗体における新規定常領域M58による薬物動態改善効果

実施例15に示したとおり、抗IL-6レセプター抗体であるヒト化PM1抗体(WT)において、定常領域をIgG1からM58に変換することにより、ヒトFcRnへの結合性が向上し、ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて薬物動態が向上することが見出された。そこで、ヒト化PM1抗体以外のIgG1抗体に対しても、定常領域をM58に変換することで薬物動態を向上できるかどうかを検討した。

ヒト化PM1抗体(WT)以外の抗体として、抗IL-31レセプター抗体であるH0L0(H0L0\_VHアミノ酸配列 配列番号:147、H0L0\_VLアミノ酸配列 配列番号:148)、抗RANKL抗体であるDNS(DNS\_VHアミノ酸配列 配列番号:149、DNS\_VLアミノ酸配列 配列番号:150)を使用した。それぞれの抗体に対して、定常領域をIgG1(配列番号:19)およびM58(配列番号:151)にしたものを作製し、実施例14に示した方法でヒトFcRnへの結合性を評価した。その結果を表14に示した。

[表14]

KD (μM)			
	WT	H0L0	DNS
IgG1	1.42	1.07	1.36
M58	1.03	0.91	1.03

表14に示したとおり、抗IL-31レセプター抗体であるH0L0、抗RANKL抗体であるDNSにおいても、定常領域をIgG1からM58に変換することで、抗IL-6レセプター抗体であるWT同様、ヒトFcRnへの結合性が向上することが確認された。これより、可変領域の抗体配列および抗原の種類に関わらず、定常領域をIgG1からM58に変換することでヒトにおける薬物動態が向上する可能性が示された。

[0191] [実施例18] CH1ドメインのシステインの及ぼすヘテロジェニティーおよび安定性への影響

実施例8に示したとおり、天然型IgG2のヘテロジェニティーを低減することを目的にIgG2のヒンジ部分のシステインおよびCH1ドメインに存在するシステインの改変を行った。各種改変体の検討の結果、野生型IgG2定常領域配列のうち、H鎖のCH1ドメインに存在するEUナンバリング131番目のシステインと133番目のアルギニンをそれぞれセリンとリジンに改変し、H鎖のupper hingeに存在するEUナンバリング219番目のシステインをセリンに改変した定常領域であるSKSC (配列番号: 154) によって、安定性を低下させることなくヘテロジェニティーを低減することが可能であることが見出された。

一方、ヘテロジェニティーを低減する方法として、H鎖のupper hingeに存在するEUナンバリング219番目のシステインのみをセリンに改変する方法、および、220番目のシステインのみをセリンに改変する方法が考えられる。IgG2のEUナンバリング219番目のシステインをセリンに改変した定常領域であるSC (配列番号: 155)、および、IgG2のEUナンバリング220番目のシステインをセリンに改変した定常領域であるCS (配列番号: 156) を定常領域と有するWT-SC (配列番号: 157) およびWT-CS (配列番号: 158) を作製し、WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SKSCおよびWT-M58とのヘテロジェニティーおよび熱安定性の比較を行った。また、WT以外の抗体として、異なる抗IL-6レセプター抗体であるF2H/L39 (F2H/L39\_VHアミノ酸配列 配列番号: 145、F2H/L39\_VLアミノ酸配列 配列番号: 146) に対して、定常領域をそれぞれIgG1 (配列番号: 19)、IgG2 (配列番号: 20)、SC (配列番号: 155)、CS (配列番号: 156)、SKSC (配列番号: 154)、M14 (配列番号: 24) にしたF2H/L39-IgG1、F2H/L39-IgG2、F2H/L39-SC、F2H/L39-CS、F2H/L39-SKSC、F2H/L39-M14を作製し、ヘテロジェニティーおよび安定性の比較を行った。

WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SC、WT-CS、WT-SKSC、WT-M58およびF2H/L39-IgG1、F2H/L39-IgG2、F2H/L39-SC、F2H/L39-CS、F2H/L39-SKSC、F2H/L39-M14のヘテロジェニティーの評価方法として、陽イオン交換クロマトグラフィーによる評価を行った。カラムとしてProPac WCX-10 (Dionex)を用い、移動相Aとして20mM Sodium

m Acetate, pH5.0、移動相Bとして20mM Sodium Acetate, 1M NaCl, pH5.0を使用し、適切な流量およびグラジエントを用いて実施した。陽イオン交換クロマトグラフィーによる評価を行った結果を図42に示した。

その結果、図42に示すとおり、WTとF2H/L39のいずれにおいても、定常領域をIgG1からIgG2に変換することでヘテロジェニティーが増大したが、定常領域をSKSCおよびM14あるいはM58に変換することでヘテロジェニティーが大幅に低減された。一方、定常領域をSCにした場合は定常領域をSKSCとした場合と同様にヘテロジェニティーが大幅に低減されたが、定常領域をCSにした場合は十分にヘテロジェニティーが改善しなかった。

一般に抗体を医薬品として開発するためにはヘテロジェニティーが少ないことに加えて、安定な製剤を調製するため高い安定性を有することが望ましい。そこで安定性の評価方法として、示走差査型熱量測定(DSC)による熱変性中間温度( $T_m$ 値)の評価を行った(VP-DSC、Microcal社製)。熱変性中間温度( $T_m$ 値)は安定性の指標であり、医薬品として安定な製剤を作製するためには、熱変性中間温度( $T_m$ 値)が高いことが望ましい(J Pharm Sci. 2008 Apr;97(4):1414-26.)。WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SC、WT-CS、WT-SKSC、WT-M58を20mM sodium acetate, 150mM NaCl, pH6.0の溶液に対して透析(EasySEP, TOMY)を行い、約0.1mg/mLのタンパク質濃度で、40℃から100℃まで1℃/minの昇温速度でDSC測定を行った。得られたDSCの変性曲線を図43に、Fab部分の $T_m$ 値を以下の表15に示した。

[表15]

	$T_m/^\circ\text{C}$
<b>WT-IgG1</b>	<b>94.8</b>
<b>WT-IgG2</b>	<b>93.9</b>
<b>WT-SC</b>	<b>86.7</b>
<b>WT-CS</b>	<b>86.4</b>
<b>WT-SKSC</b>	<b>93.7</b>
<b>WT-M58</b>	<b>93.7</b>

WT-IgG1およびWT-IgG2の $T_m$ 値はほぼ同等で約94℃程度(IgG2のほうが約1℃低い)であったのに対して、WT-SCおよびWT-CSの $T_m$ 値は約86℃であり、WT-IgG1お



よびWT-IgG2と比較して著しくT<sub>m</sub>値が低下していた。一方、WT-M58、WT-SKSCのT<sub>m</sub>値は約94°Cであり、ほぼWT-IgG1およびWT-IgG2と同等であった。WT-SCおよびWT-CSは安定性がIgG2と比較して著しく低いことから、医薬品として開発するためには、CH1ドメインのシステインもセリンに改変したWT-SKSCおよびWT-M58のほうが好ましいと考えられた。WT-SCおよびWT-CSのT<sub>m</sub>値がIgG2と比較して大幅に低下した理由として、WT-SCおよびWT-CSはIgG2のジスルフィド結合パターンとは異なる様式を取っているためと考えられた。

また、DSC変性曲線を比較した場合、WT-IgG1、WT-SKSC、WT-M58のFab部分の変性ピークはシャープかつ単一であったのに対して、WT-SCおよびWT-CSはこれらと比較して、Fab部分の変性ピークがブロードであり、WT-IgG2はFab部分の変性ピークの低温側にショルダーピークが認められた。DSCの変性ピークは単一成分の場合は通常シャープな変性ピークを示すが、T<sub>m</sub>が異なる複数成分(つまりヘテロジェニティー)が存在する場合、変性ピークはブロードになると考えられる。すなわち、WT-IgG2、WT-SCおよびWT-CSには複数成分存在し、WT-SCおよびWT-CSは、天然型IgG2のヘテロジェニティーが十分低減されていない可能性が示唆された。このことから、野生型IgG2のヘテロジェニティーはヒンジ部分のシステインのみならず、CH1ドメインに存在するシステインの両方が関与していると考えられ、DSC上のヘテロジェニティーを低減するためにはヒンジ部分のシステインのみならず、CH1ドメインのシステインも改変する必要があると考えられた。また、上述のとおり、ヒンジ部分のシステインのみならず、CH1ドメインのシステインを改変することで初めて野生型IgG2と同等の安定性を有することが可能である。

以上より、IgG2のヒンジ領域に由来するヘテロジェニティーを低減した定常領域として、ヒンジ部分のシステインのみをセリンに置換した定常領域であるSCとCSはヘテロジェニティーおよび安定性の観点で不十分であると考えられ、ヒンジ部分のシステインに加えてCH1ドメインに存在するEUナンバリング131番目のシステインもセリンに置換することで初めてIgG2と同等の安定性を維持しつつヘテロジェニティーを大幅に低減することが可能であることが見出された。そのような定常領域としては、上述のM14、M31、M58、M73等が挙げられ、特にM58およびM73は薬物動態が向上し、安定

性が高く、ヘテロジェニティーが低減されていることから、抗体医薬品の定常領域として非常に有用であると考えられた。

[0192] [実施例19] PK/PDが改善した完全ヒト化IL-6レセプター抗体の作製

TOCILIZUMAB(H鎖 WT-IgG1(配列番号:15)、L鎖 WT(配列番号:105))に対して、PK/PDが改善した完全ヒト化IL-6レセプター抗体の作製するために以下に示す分子を作製した。

F2H-IgG1のka向上のため、実施例2で得られたアフィニティー増強の改変である、35番のトリプトファンのバリンへの置換、および50番のチロシンのフェニルアラニンへの置換、62番のセリンのスレオニンへの置換を行なった。また、免疫原性リスクを上昇させることなくpIを低下させるため、102番のチロシンをバリンへと置換、105番のグルタミンをグルタミン酸へと置換、107番のイソロイシンをスレオニンへと置換し、定常領域をIgG1からM83に置換したものとして、VH5-M83(配列番号:139(アミノ酸配列))を作製した。また、L39のka向上のため、27番のグルタミン酸をグルタミンに置換したVL5-kappa(配列番号:181(アミノ酸配列))を作製した。さらに上記実施例で見出されたTOCILIZUMABの可変領域および定常領域の変異、および、新たに見出された変異を複数組み合わせたTOCILIZUMAB改変体を作製し、各種スクリーニングを実施した結果、完全ヒト化IL-6レセプター抗体として、Fv3-M73(H鎖 VH4-M73 配列番号:182、L鎖 VL1-kappa 配列番号:183)、Fv4-M73(H鎖 VH3-M73 配列番号:180、L鎖 VL3-kappa 配列番号:181)、Fv5-M83(H鎖 VH5-M83 配列番号:139、L鎖 VL5-kappa 配列番号:138)を見出した。

作製したFv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83のIL-6レセプターへのアフィニティーをTOCILIZUMABと比較した(方法は参考例参照)。これらの抗体のIL-6レセプターへのアフィニティーを測定した結果を表16に示した。また、BaF/gp130の中和活性をTOCILIZUMABおよびコントロール(参考例の公知の高親和性高IL-6レセプター抗体、US 2007/0280945におけるVQ8F11-21 hIgG1)と比較した(方法は参考例参照)。これらの抗体のBaF/gp130による生物活性を測定した結果を図44(IL-6終濃度 300 ng/mL: TOCILIZUMAB、コントロール、Fv5-M83)および図45(IL-6終濃度 30 ng/mL: TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73)に示した。表16に示すとおり、Fv3-M

73、Fv4-M73は、TOCILIZUMABと比較して2～3倍程度強いアフィニティーを有し、Fv5-M83はTOCILIZUMABと比較して100倍程度強いアフィニティーを示した(Fv5-M83ではアフィニティーの測定が困難であったため、定常領域をIgG1にしたFv5-IgG1を用いてアフィニティーを測定した、定常領域は一般にアフィニティーに影響しないと考えられる)。また、図45に示すとおりFv3-M73、Fv4-M73は、TOCILIZUMABと比較してやや強い活性を示し、図44に示すとおりFv5-M83はTOCILIZUMABと比較して50%阻害濃度として100倍以上の極めて強い活性を有し、且つ、公知の高親和性高IL-6レセプター抗体であるコントロールと比較しても50%阻害濃度として約10倍程度高い中和活性を示した。

[表16]

	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD (M)
<b>TOCILIZUMAB</b>	<b>4.0E+05</b>	<b>1.1E-03</b>	<b>2.7E-09</b>
<b>Fv3-M73</b>	<b>8.5E+05</b>	<b>8.7E-04</b>	<b>1.0E-09</b>
<b>Fv4-M73</b>	<b>7.5E+05</b>	<b>1.0E-03</b>	<b>1.4E-09</b>
<b>Fv5-M83</b>	<b>1.1E+06</b>	<b>2.8E-05</b>	<b>2.5E-11</b>

TOCILIZUMAB、コントロール、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83の等電点を当業者公知の方法により等電点電気泳動により測定した結果、TOCILIZUMABの等電点は約9.3、コントロールは約8.4～8.5、Fv3-M73は約5.7～5.8、Fv4-M73は約5.6～5.7、Fv5-M83は5.4～5.5であり、いずれの抗体もTOCILIZUMABおよびコントロールと比較して等電点が大幅に低下した。また、可変領域VH/VLの理論等電点をGENETYX(GENETYX CORPORATION)により計算したところ、TOCILIZUMABの理論等電点は9.20、コントロールは7.79、Fv3-M73は5.49、Fv4-M73は5.01、Fv5-M83は4.27であり、いずれの抗体もTOCILIZUMABおよびコントロールと比較して等電点が大幅に低下した。よって、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83はTOCILIZUMABおよびコントロールと比較して薬物動態が向上していると考えられた。

TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83の可変領域配列に存在するT-cellエピトープをTEPITOPE(Methods. 2004 Dec;34(4):468-75)を用いて解析を行った。その結果、TOCILIZUMABは多くの配列がHLAに結合するT-cellエピトープ

が存在すると予測されたが、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83はT-cellエピトープに結合すると予測された配列が大幅に減少した。また、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83はフレームワークにマウス配列が残存せず完全ヒト化されている。これらのことから、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83の免疫原性はTOCILIZUMABと比較して大幅に免疫原性リスクが低減されている可能性が示唆された。

[0193] [実施例20] 完全ヒト化IL-6レセプター抗体のサルPK/PD試験

TOCILIZUMAB、コントロール、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83をカニクイザルに1 mg/kgで静脈内に単回投与し血漿中濃度推移を評価した(方法は参考例参照)。TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83の静脈内投与後の血漿中濃度推移を図46に示した。その結果、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83はいずれもTOCILIZUMABおよびコントロールと比較してカニクイザルにおいて大幅に血漿中滞留性が改善した。なかでも、Fv3-M73とFv4-M73の血漿中滞留性はTOCILIZUMABと比較して大幅に改善した。

カニクイザル膜型IL-6レセプターがどの程度中和されているかの薬効を評価するために、抗体投与6日目から18日目(TOCILIZUMABに関しては3日目から10日目)までカニクイザルIL-6 5  $\mu$ g/kgを腰背部に連日皮下投与し、24時間後の各個体のCRP濃度を測定した(方法は参考例参照)。各抗体投与時のCRP濃度推移を図47に示した。カニクイザル可溶型IL-6レセプターがどの程度中和されているかの薬効を評価するために、カニクイザル血漿中の非結合型のカニクイザル可溶型IL-6レセプター濃度を測定し、可溶型IL-6レセプターの中和率を計算した(方法は参考例参照)。各抗体投与時の可溶型IL-6レセプターの中和率の推移を図48に示した。

Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83はいずれもTOCILIZUMABおよび公知の高親和性抗IL-6レセプター抗体であるコントロールと比較してカニクイザル膜型IL-6レセプターをより持続的に中和しCRPの増加を長期間抑制した。また、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83はいずれもTOCILIZUMABおよびコントロールと比較してカニクイザル可溶型IL-6レセプターをより持続的に中和し非結合型のカニクイザル可溶型IL-6レセプターの増加を長期間抑制した。これより膜型IL-6レセプターおよび可溶型IL-6レセプターの中和の持続性に関しては、Fv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M8



3はいずれもTOCILIZUMABおよびコントロールよりも優れていることが見出された。なかでもFv3-M73とFv4-M73の中和の持続性は極めて優れていた。一方、Fv5-M83のほうがFv3-M73とFv4-M73よりCRPおよび非結合型カニクイザル可溶性IL-6レセプターを低く抑制していることから、Fv5-M83は膜型IL-6レセプターおよび可溶性IL-6レセプターをFv3-M73とFv4-M73および公知の高親和性抗IL-6レセプター抗体であるコントロールよりも強力に中和していると考えられた。これはFv5-M83がコントロールよりもIL-6レセプターへのアフィニティーが強く、且つ、BaF/gp130における生物活性が強いことがカニクイザルのin vivoにおいて反映された結果であると考えられる。

これらのことから、TOCILIZUMABおよびコントロールと比較して、Fv3-M73とFv4-M73は抗IL-6レセプター中和抗体として作用の持続性が極めて優れており投与頻度および投与量を大幅に低減することが可能であり、また、Fv5-M83は抗IL-6レセプター中和抗体として作用の強さに極めて優れており、また作用の持続性にも優れていることが見出された。よってFv3-M73、Fv4-M73、およびFv5-M83はIL-6アンタゴニストとしての医薬品として有用であると考えられる。

[0194] [参考例]

組み換えカニクイザル可溶性IL-6レセプター(cIL-6R)の調製

公開されているアカゲザルIL-6レセプター遺伝子配列 (Birney et al, Ensembl 2006, Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34(Database issue):D556-61.) を元にオリゴDNAプライマーを作製し、カニクイザル脾臓から調製されたcDNAを鋳型とし、プライマーを用いて、PCR法によりカニクイザルIL-6レセプター遺伝子全長をコードするDNA断片を調製した。得られたDNA断片を動物細胞発現ベクターへ挿入し、これを用いてCHO定常発現株(cyno.sIL-6R産生CHO細胞)を作製した。cyno.sIL-6R産生CHO細胞の培養液をHisTrapカラム(GEヘルスケアバイオサイエンス)で精製後、Amicon Ultra-15 Ultracel-10k(Millipore)を用いて濃縮し、Superdex200pg16/60ゲルろ過カラム(GEヘルスケアバイオサイエンス)でさらに精製を行い、可溶性カニクイザルIL-6レセプター(以下、cIL-6R)の最終精製品とした。

[0195] 組み換えカニクイザルIL-6(cIL-6)の調製

カニクイザルIL-6は以下のように調製した。SWISSPROT Accession No.P79341に登

録されている212アミノ酸をコードする塩基配列を作成し、動物細胞発現ベクターにクローニングし、CHO細胞に導入することで定常発現細胞株を作製した(cyno.IL-6産生CHO細胞)。cyno.IL-6産生CHO細胞の培養液をSP-Sepharose/FFカラム(GEヘルスケアバイオサイエンス)で精製後、Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)を用いて濃縮し、Superdex75pg26/60ゲルろ過カラム(GEヘルスケアバイオサイエンス)でさらに精製を行い、Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)を用いて濃縮し、カニクイザルIL-6(以下、cIL-6)の最終精製品とした。

[0196] 公知高親和性抗IL-6レセプター抗体の作製

公知の高親和性抗IL-6レセプター抗体として、US 2007/0280945 A1に記載されている高親和性抗IL-6レセプター抗体であるVQ8F11-21 hIgG1(US 2007/0280945 A1, H鎖アミノ酸配列:配列番号:19、L鎖アミノ酸配列:配列番号:27)を発現させるため、動物細胞発現用ベクターを構築した。抗体可変領域については、合成オリゴDNAを組み合わせたPCR法(assembly PCR)により作製し、定常領域についてはIgG1を使用した。Assembly PCR法により抗体可変領域と定常領域を結合させ、動物発現用ベクターへ挿入し、目的のH鎖発現ベクターおよびL鎖発現ベクターを作製した。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定した。作製した発現ベクターを用い、発現・精製を行った。発現・精製は実施例1に記載した方法で行い、高親和性抗IL-6レセプター抗体(以降、コントロール、と記す)を得た。

[0197] BiacoreによるIL-6レセプターへの結合評価

Biacore T100 (GE Healthcare) を用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。センサーチップ上にアミンカップリング法でanti-IgG ( $\gamma$ -chain specific) F(ab')<sub>2</sub>を適当量固定化し、次にpH7.4において目的の抗体を結合させ、さらにpH7.4において種々の濃度に調整したIL-6レセプターであるSR344をアナライトとして流し、抗体とSR344の相互作用を測定した。測定は全て37°Cで実施した。測定で得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーターである結合速度定数  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) を算出し、その値をもとに  $K_D$  (M) を算出した。各パラメーターの算出には Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)を用いた。

[0198] サルPK/PD試験による抗体血漿中濃度、CRP濃度、非結合型可溶型IL-6レセプタ

### 一の測定

カニクイザル血漿中濃度測定はELISA法にて当業者公知の方法で測定した。CRP濃度はサイアス R CRP (関東化学株式会社)にて、自動分析装置(TBA-120FR、東芝メディカルシステムズ株式会社)を用いて測定した。

カニクイザル血漿中の非結合型のカニクイザル可溶型IL-6レセプター濃度を以下の通り測定した。カニクイザルの血漿30  $\mu$  Lを0.22  $\mu$  mのフィルターカップ(Millipore)において乾燥させた適量のrProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)樹脂に添加することで血漿中に存在する全てのIgG型抗体(カニクイザルIgG、抗ヒトIL-6レセプター抗体および抗ヒトIL-6レセプター抗体-カニクイザル可溶型IL-6レセプター複合体)をProteinAに吸着させた。その後、高速遠心機でスピンドウンし、パス溶液を回収した。パス溶液にはproteinAに結合した抗ヒトIL-6レセプター抗体-カニクイザル可溶型IL-6レセプター複合体は含まれないため、proteinAパス溶液中のカニクイザル可溶型IL-6レセプター濃度を測定することによって、非結合型の可溶型IL-6レセプター濃度を測定可能である。カニクイザル可溶型IL-6レセプター濃度は、上記で作製したカニクイザル可溶型IL-6レセプター(cIL-6R)をスタンダードに用いて、ヒトIL-6レセプター濃度を測定する当業者公知の方法で測定した。可溶型IL-6レセプターの中和率は以下の計算式によって計算した。

(抗体投与後の非結合型の可溶性IL-6レセプター濃度÷抗体投与前の可溶性IL-6レセプター濃度)×100

### 産業上の利用可能性

[0199] 本発明により、ヒト化抗IL-6レセプターIgG1抗体であるTOCILIZUMABの可変領域および定常領域のアミノ酸配列を改変することで、抗原中和能を増強させつつ、薬物動態を向上させることで投与頻度を少なくし持続的に治療効果を発揮し、且つ、免疫原性、安全性、物性を改善させ、TOCILIZUMABより優れた第2世代の分子が提供された。さらに、医薬品として適した抗体定常領域が提供された。

## 請求の範囲

- [1] 以下の(a)～(y)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；
- (a) 配列番号: 1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (b) 配列番号: 1に記載のアミノ酸配列において5番目のTrpが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (c) 配列番号: 2に記載のアミノ酸配列において1番目のTyrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (d) 配列番号: 2に記載のアミノ酸配列において8番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (e) 配列番号: 2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (f) 配列番号: 3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (g) 配列番号: 3に記載のアミノ酸配列において2番目のLeuが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (h) 配列番号: 3に記載のアミノ酸配列において5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (i) 配列番号: 3に記載のアミノ酸配列において7番目のAlaが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (j) 配列番号: 3に記載のアミノ酸配列において8番目のMetが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (k) 配列番号: 3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (l) 配列番号: 3に記載のアミノ酸配列において2番目のLeu、7番目のAlaおよび8番目のMetが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
  - (m) 配列番号: 4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、



- (n) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において4番目のGlnが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (o) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において9番目のTyrが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (p) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において11番目のAsnが他のアミノ酸に置換されているCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (q) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (r) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (s) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において3番目のGlyが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (t) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において9番目のTyrが他のアミノ酸に置換されているCDR1及び配列番号:6に記載のアミノ酸配列において3番目のGlyが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (u) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (v) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において1番目のGlnおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (w) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2、および配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (x) (k)に記載の重鎖可変領域および(v)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体、又は
- (y) (e)のCDR2をさらに含む(x)に記載の抗体。
- [2] 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrが他のアミノ酸に置換されているCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗IL-6レセプター抗体。
- [3] 以下の(a)～(y)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；

- (a) 配列番号: 7に記載のアミノ酸配列において13番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (b) 配列番号: 7に記載のアミノ酸配列において16番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (c) 配列番号: 7に記載のアミノ酸配列において23番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (d) 配列番号: 7に記載のアミノ酸配列において30番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (e) 配列番号: 7に記載のアミノ酸配列において13番目のArg、16番目のGln、23番目のThrおよび30番目のThrが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (f) 配列番号: 8に記載のアミノ酸配列において8番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (g) 配列番号: 9に記載のアミノ酸配列において4番目のMetが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (h) 配列番号: 9に記載のアミノ酸配列において5番目のLeuが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (i) 配列番号: 9に記載のアミノ酸配列において16番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (j) 配列番号: 9に記載のアミノ酸配列において27番目のValが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (k) 配列番号: 9に記載のアミノ酸配列において4番目のMet、5番目のLeu、16番目のArgおよび27番目のValが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (l) 配列番号: 10に記載のアミノ酸配列において3番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (m) 配列番号: 11に記載のアミノ酸配列において18番目のArgが他のアミノ酸に置換されたFR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

- (n) 配列番号:12に記載のアミノ酸配列において11番目のLysが他のアミノ酸に置換されたFR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (o) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において23番目のGlnが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (p) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において24番目のProが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (q) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において27番目のIleが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (r) 配列番号:13に記載のアミノ酸配列において23番目のGln、24番目のProおよび27番目のIleが他のアミノ酸に置換されたFR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (s) 配列番号:14に記載のアミノ酸配列において10番目のLysが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (t) 配列番号:10に記載のアミノ酸配列において5番目のSerが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (u) 配列番号:10に記載のアミノ酸配列において3番目のGlnおよび5番目のSerが他のアミノ酸に置換されたFR4を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (v) 配列番号:184に記載のアミノ酸配列を有するFR3を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (w) (e)に記載のFR1、(f)に記載のFR2、(k)に記載のFR3および(l)または(u)に記載のFR4を含む重鎖可変領域を含む抗体、
- (x) (m)に記載のFR1、(n)に記載のFR2、(r)に記載のFR3および(s)に記載のFR4を含む軽鎖可変領域を含む抗体、又は
- (y) (w)に記載の重鎖可変領域、および、(x)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

[4] 以下の(a)～(l)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；

- (a) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR1を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (b) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、

- (c) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (d) 配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrおよび16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する重鎖可変領域を含む抗体、
- (e) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR1を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (f) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (g) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (h) 配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrおよび4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (i) 配列番号:6に記載のアミノ酸配列において5番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR3を有する軽鎖可変領域を含む抗体、
- (j) (a)に記載のCDR1、(d)に記載のCDR2および配列番号:3に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗体、
- (k) (e)に記載のCDR1、(h)に記載のCDR2および(i)に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体、又は
- (l) (j)に記載の重鎖可変領域、および、(k)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

[5] 以下の(a)～(f)いずれかに記載の抗IL-6レセプター抗体；

- (a) 配列番号:1に記載のアミノ酸配列において1番目のSerが他のアミノ酸配列に置換されたCDR1、配列番号:2に記載のアミノ酸配列において9番目のThrおよび16番目のSerが他のアミノ酸に置換されたCDR2、および配列番号:3に記載のアミノ酸配列において1番目のSerおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR3を含む重鎖可変領域を含む抗体、
- (b) 配列番号:4に記載のアミノ酸配列において1番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR1、配列番号:5に記載のアミノ酸配列において2番目のThrおよび4番目のArgが他のアミノ酸に置換されたCDR2、および配列番号:6に記載のアミノ酸配列に



において1番目のGlnおよび5番目のThrが他のアミノ酸に置換されたCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体、

(c) 配列番号:22に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、

(d) 配列番号:23に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、

(e) (a)に記載の重鎖可変領域および(b)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体、又は

(f) (c)に記載の重鎖可変領域および(d)に記載の軽鎖可変領域を含む抗体。

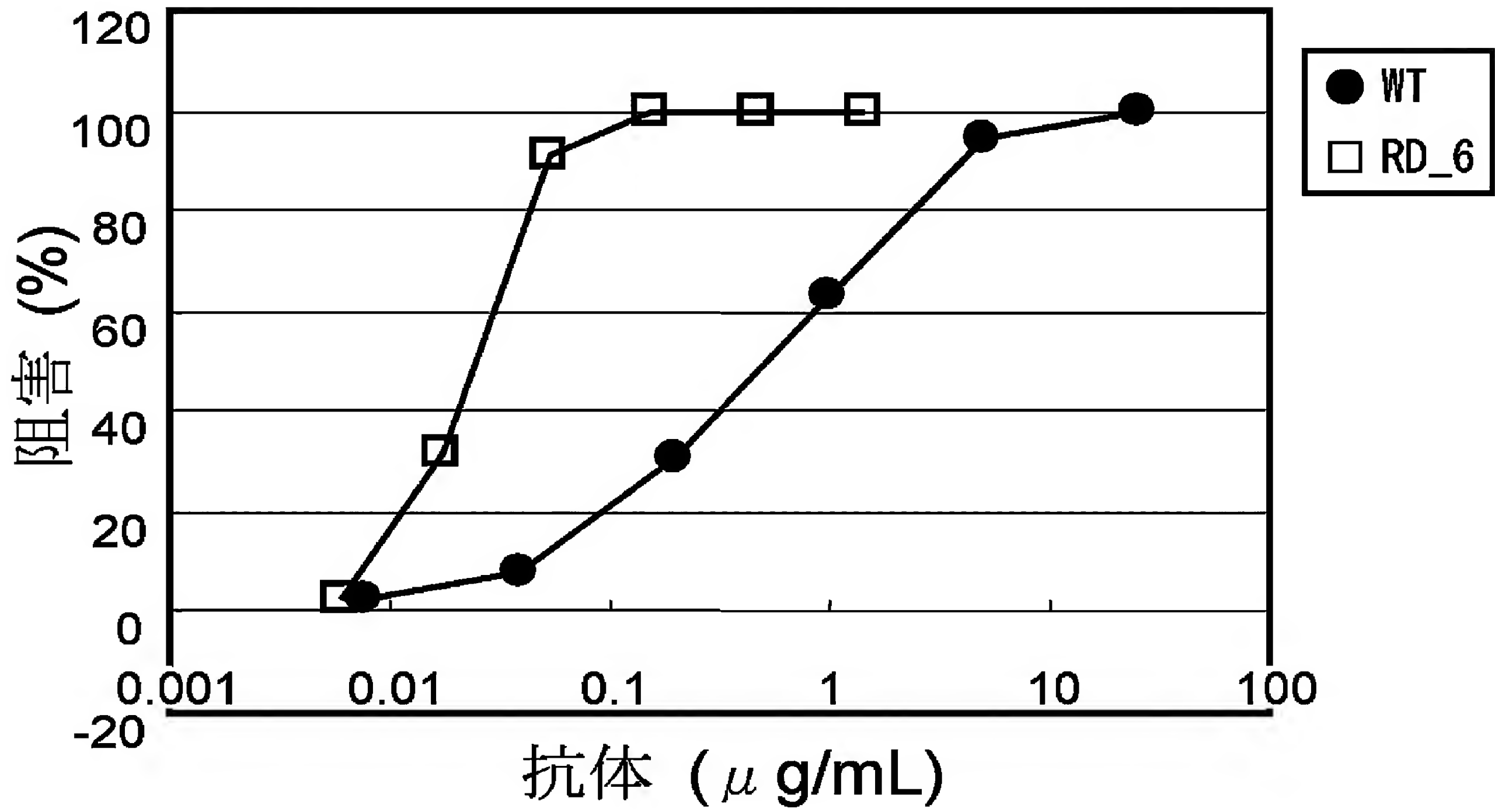
[6] IL-6レセプターへの結合活性が1nM以下である抗IL-6受容体抗体。

[7] 全長抗体の実測等電点が7.0以下または可変領域の理論等電点が5.0以下である抗IL-6レセプター抗体。

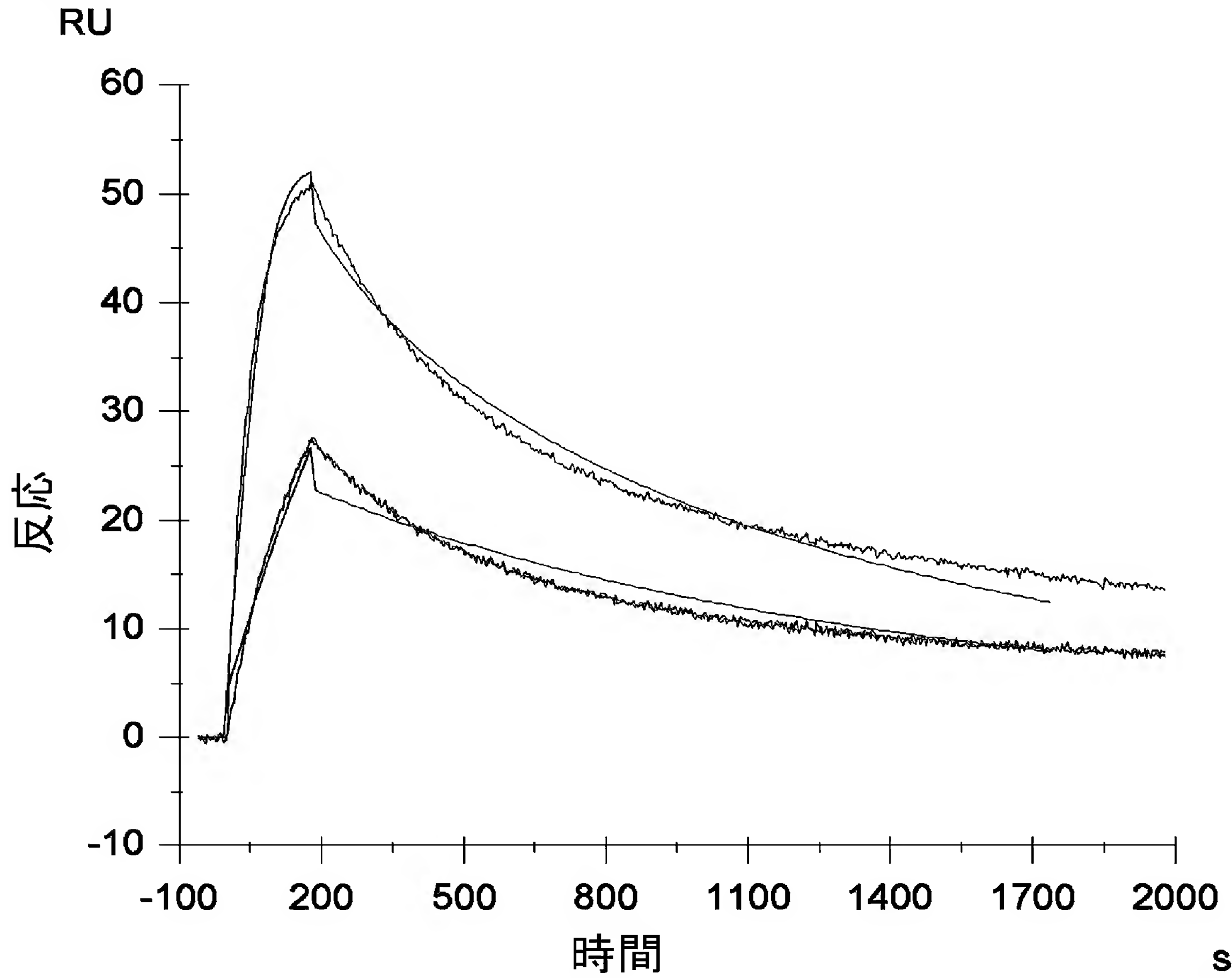
[8] 20mM Histidine-HCl, 150mM NaCl, pH6.5～7.0の緩衝液下で抗体濃度が100mg/mLである条件下において、25℃で1ヶ月経過後の抗体の会合体比率の増加が0.3%以下であることを特徴とする抗IL-6レセプター抗体。

[9] 請求項6～8のいずれかに記載の抗体を含む医薬組成物。

[図1]



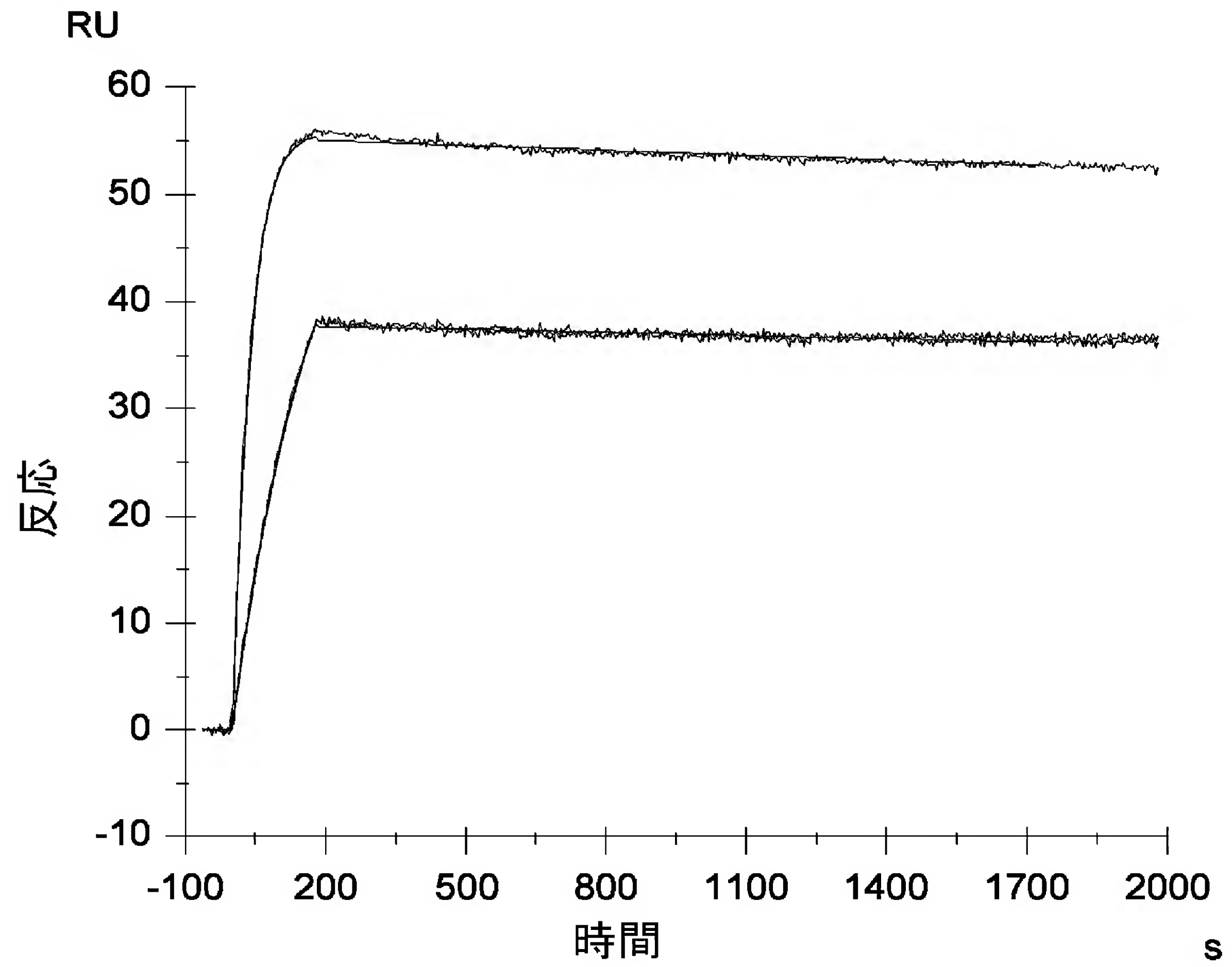
[図2]



WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

[図3]



[図4-1]

WT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
	SDHAW (配列番号 : 1)	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 2)	SLARTTAMDY (配列番号 : 3)	RASQDISSYLN (配列番号 : 4)	YTSRLHS (配列番号 : 5)	QQGNTLPYT (配列番号 : 6)
RD_68	WDHAW (配列番号 : 26)					
RD_12		YISYSGITSYNPSLKS (配列番号 : 44)				
RD_61		YISYSGITNYNPSLKS (配列番号 : 45)				
RD_79		YISYSGIRTYNPSLKS (配列番号 : 43)				
RD_82		EISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 42)				
RD_2			ILARTTAMDY (配列番号 : 46)			
RD_3			SLARATAMDY (配列番号 : 51)			
RD_4			VLARTTAMDY (配列番号 : 47)			
RD_6			LLARATAMDY (配列番号 : 57)			
RD_80			ILARTTAMDY (配列番号 : 48)			
RD_78			SIARTTVLDY (配列番号 : 65)			
RD_81			SLARTTSMDY (配列番号 : 54)			
RD_83			SLARTTAMDY (配列番号 : 52)			
RD_84			SIARTTAMDY (配列番号 : 50)			
RD_26			RASRDISSYLN (配列番号 : 67)			QQSNTLPYT (配列番号 : 75)
RD_72			RASQDISSFLN (配列番号 : 69)			GQGN <del>S</del> LPLYT (配列番号 : 78)
RD_22						QQGN <del>R</del> LPLYT (配列番号 : 76)
RD_23						GQGN <del>T</del> LPLYT (配列番号 : 72)
RD_28						SQGN <del>T</del> LPLYT (配列番号 : 74)
RDC_15L						



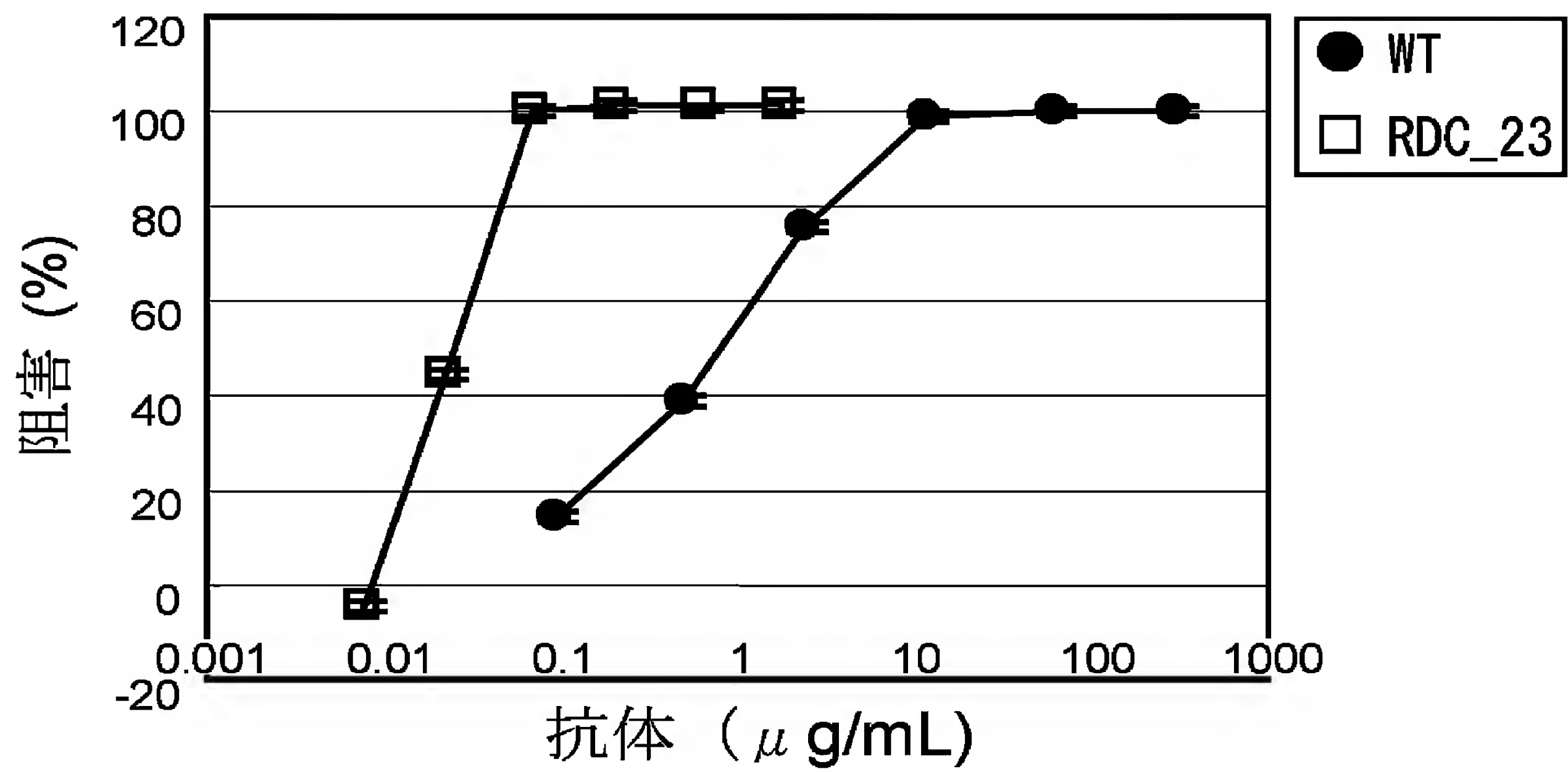
[図4-2]

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
WT	SDHAW S (配列番号 : 1)	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 2)	SLARTTAMDY (配列番号 : 3)	RASQDISSYL N (配列番号 : 4)	YTSRLHS (配列番号 : 5)	QQGNTLPYT (配列番号 : 6)
RD_37	IDHAW S (配列番号 : 27)					
RD_8	DDHAW S (配列番号 : 28)					
RD_9	SDHAIS (配列番号 : 40)					
RD_11	NDHAW S (配列番号 : 29)					
RD_30	SDHAV S (配列番号 : 41)					
RD_31	RDHAW S (配列番号 : 30)					
RD_32	VDHAW S (配列番号 : 31)					
RD_33	FDHAW S (配列番号 : 32)					
RD_34	ADHAW S (配列番号 : 33)					
RD_35	QDHAW S (配列番号 : 34)					
RD_36	YDHAW S (配列番号 : 35)					
RD_38	LDHAW S (配列番号 : 36)					
RD_42	HDHAW S (配列番号 : 37)					
RD_45	EDHAW S (配列番号 : 38)					
RD_46	GDHAW S (配列番号 : 39)					
RD_5			LLARTTAMDY (配列番号 : 49)			
RD_18			FASQDISSYL N (配列番号 : 66)			
RD_20			RASIDISSYL N (配列番号 : 68)			
RD_27			RASQDISSYLS (配列番号 : 70)			
RD_73			RASQDISSFEL N (配列番号 : 69)			
RD_29					NQGNTLPYT (配列番号 : 73)	
RDC_14H			SLARSTAMDY (配列番号 : 53)			
PF_3H			SLARTTVMDY (配列番号 : 55)			
PF_4H			SLARTTALDY (配列番号 : 56)			

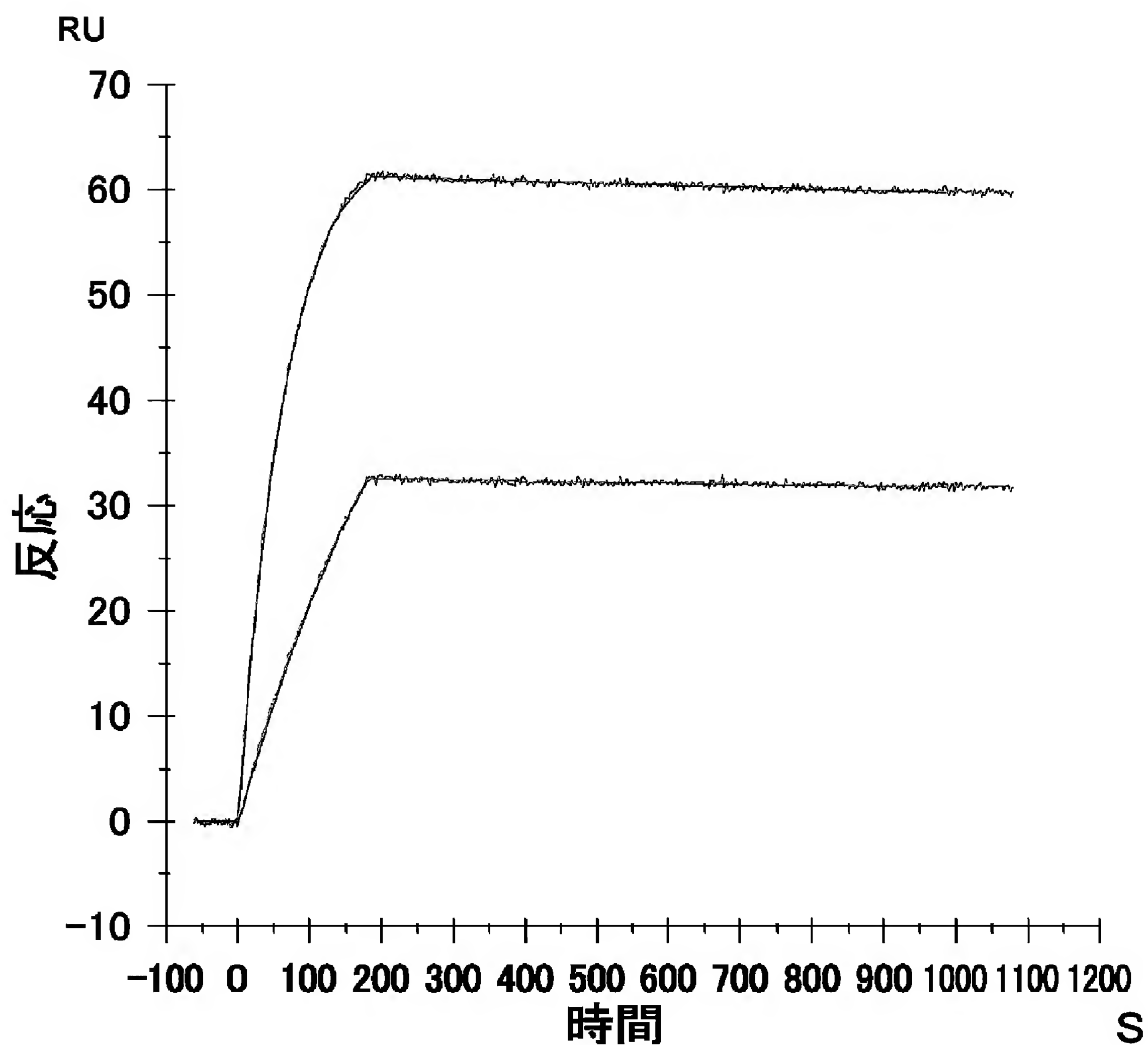
[図5]

HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
WT SDHWS (配列番号 : 1)	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 2)	SLARTTAMDY (配列番号 : 3)	RASQDISSYLN (配列番号 : 4)(配列番号 : 5)	YTSRLHS	QQGNTLPYT (配列番号 : 6)
RDC_2H		VLARATAMDY (配列番号 : 58)			
RDC_3H		ILARATAMDY (配列番号 : 59)			
RDC_4H		ILARATAMDY (配列番号 : 60)			
RDC_5H		VLARITAMDY (配列番号 : 61)			
RDC_6H		ILARITAMDY (配列番号 : 62)			
RDC_7H		ILARITAMDY (配列番号 : 63)			
RDC_8H		LLARITAMDY (配列番号 : 64)			
RDC_27H	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 45)	LLARATAMDY (配列番号 : 57)			
RDC_28H	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 45)	VLARATAMDY (配列番号 : 58)			
RDC_30H	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 45)	ILARATAMDY (配列番号 : 59)			
RDC_29H	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 45)	VLARITAMDY (配列番号 : 61)			
RDC_32H	YISYSGITTYNPSLKS (配列番号 : 45)	ILARITAMDY (配列番号 : 62)			
RDC_11L				GQGNRLPYT (配列番号 : 79)	

[図6]



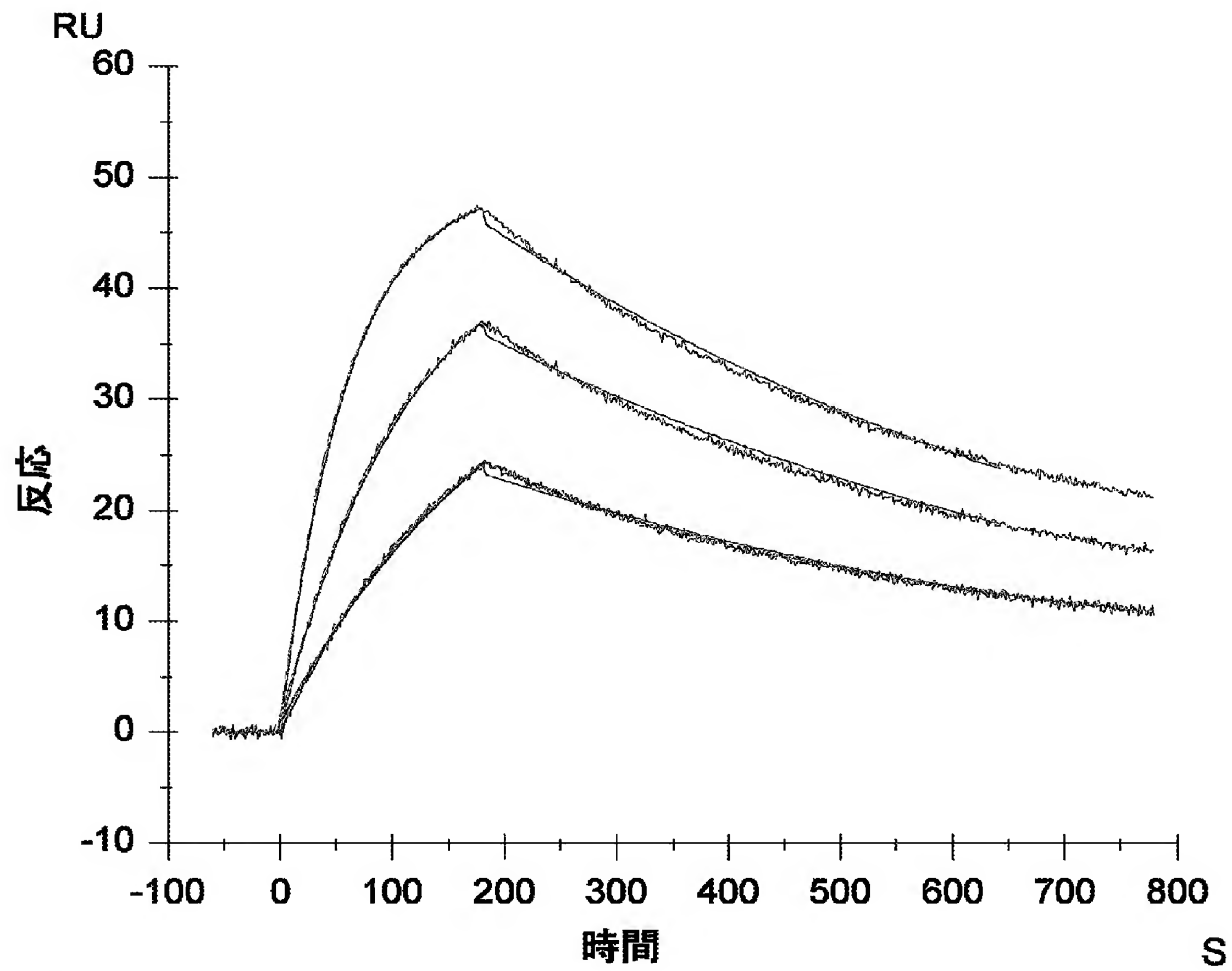
[図7]



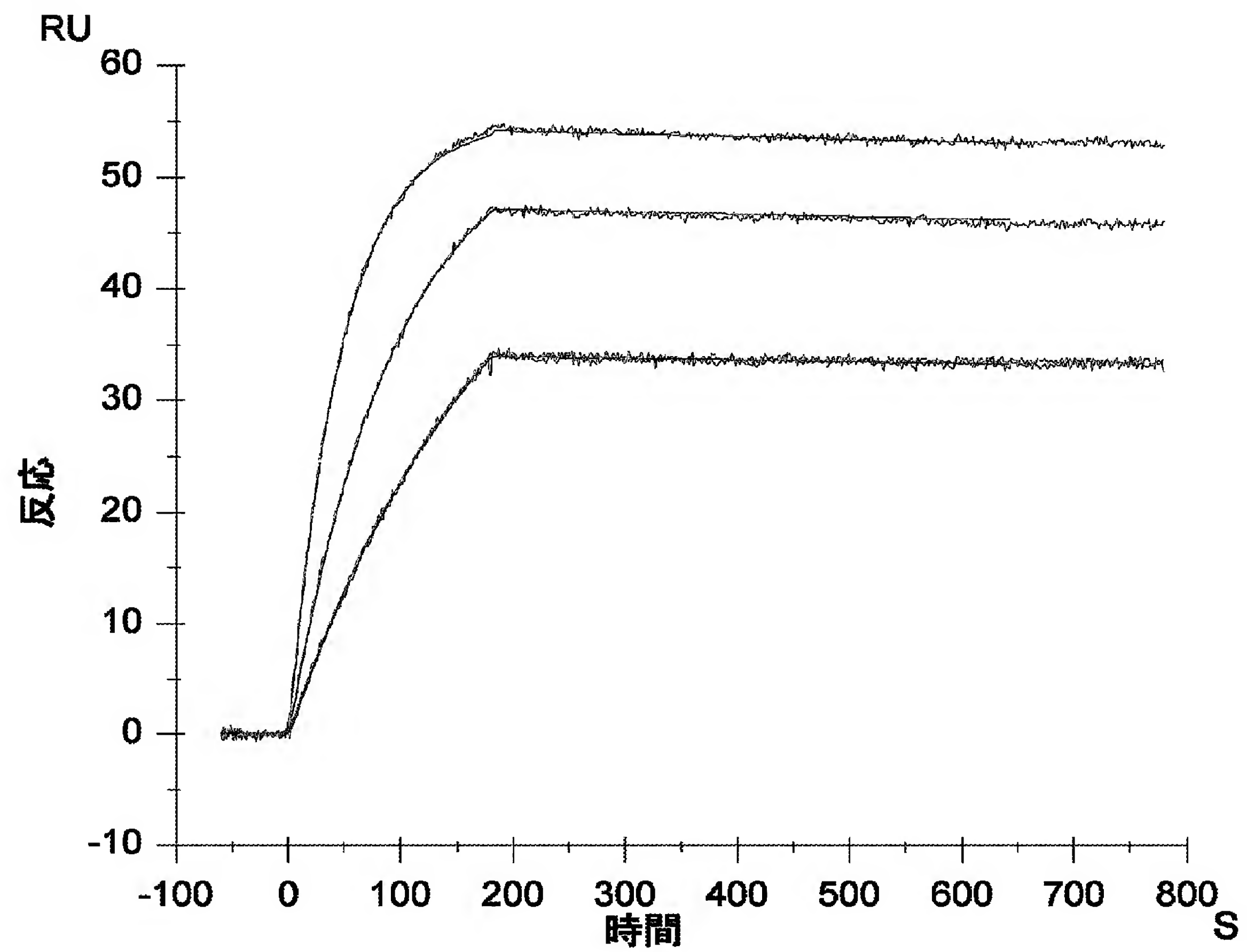
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

[図8]



[図9]

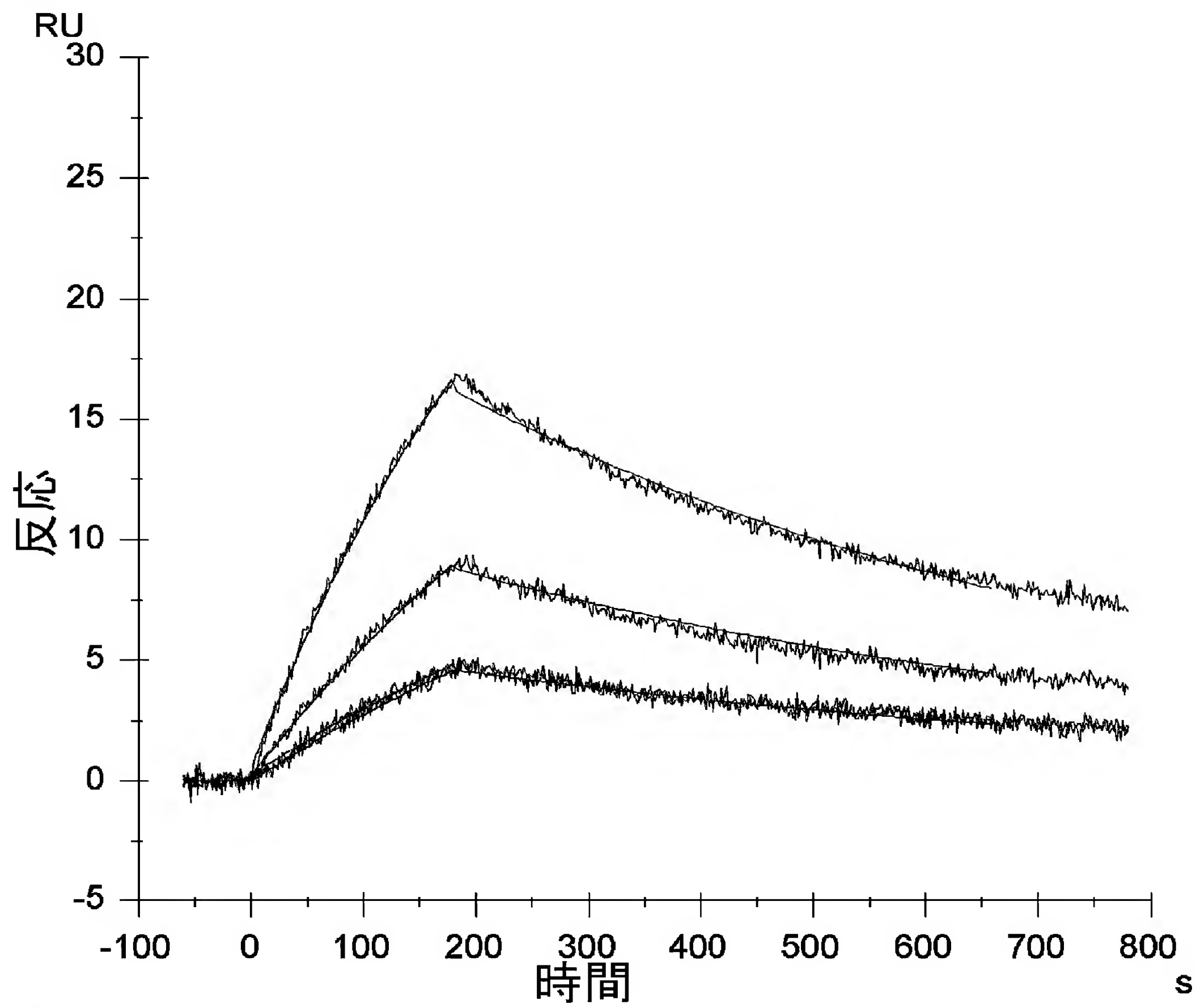




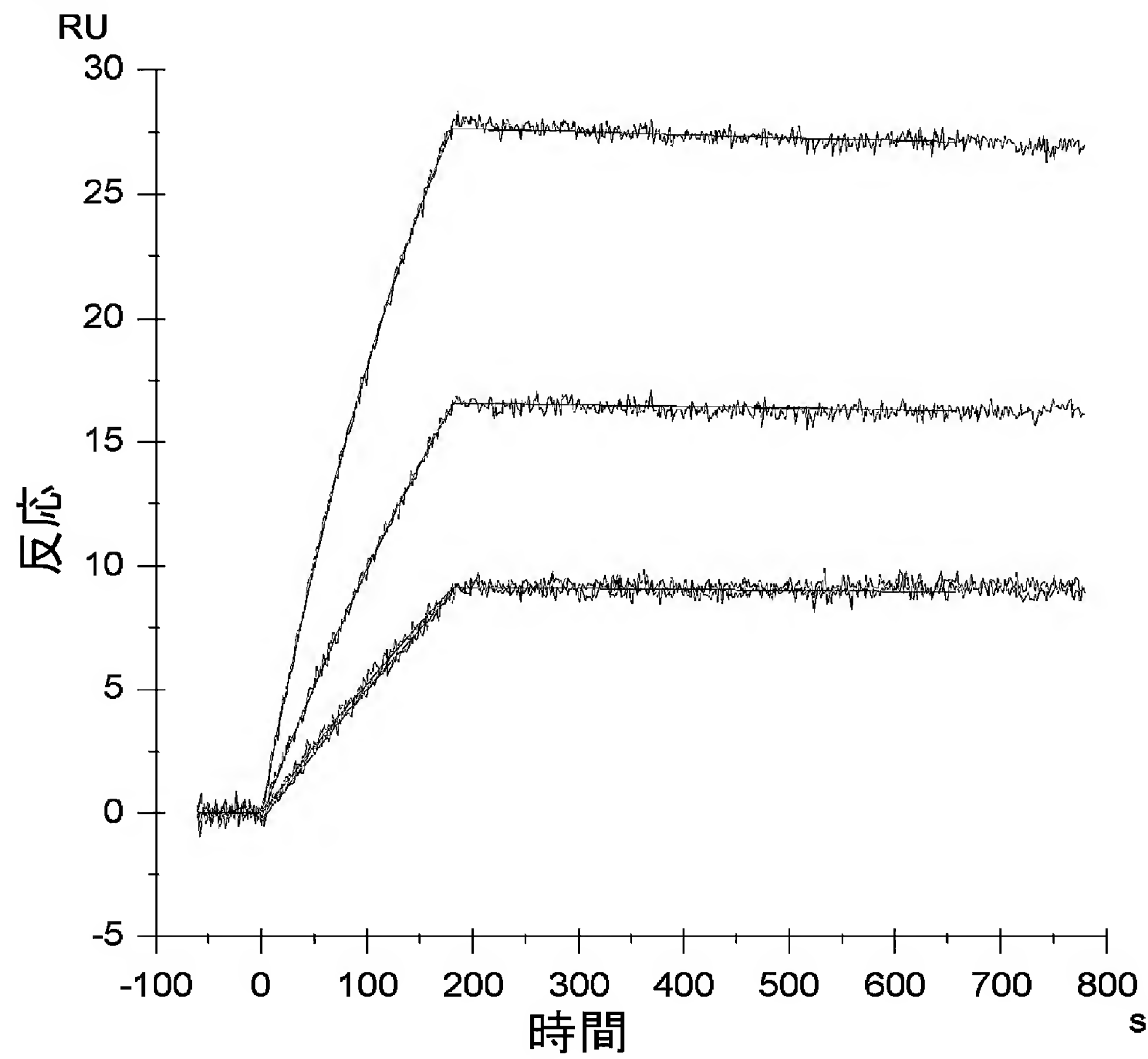
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

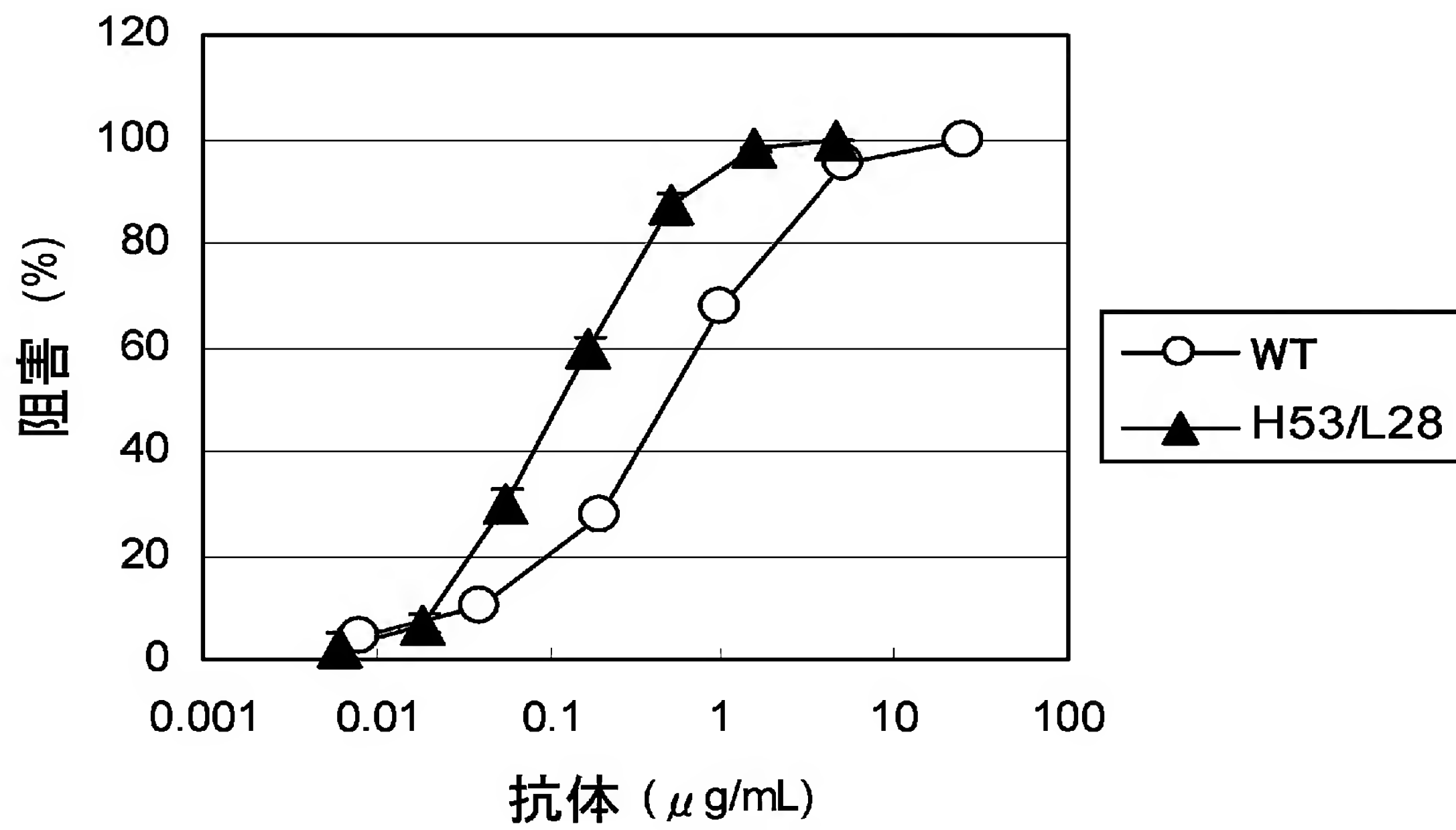
[図10]



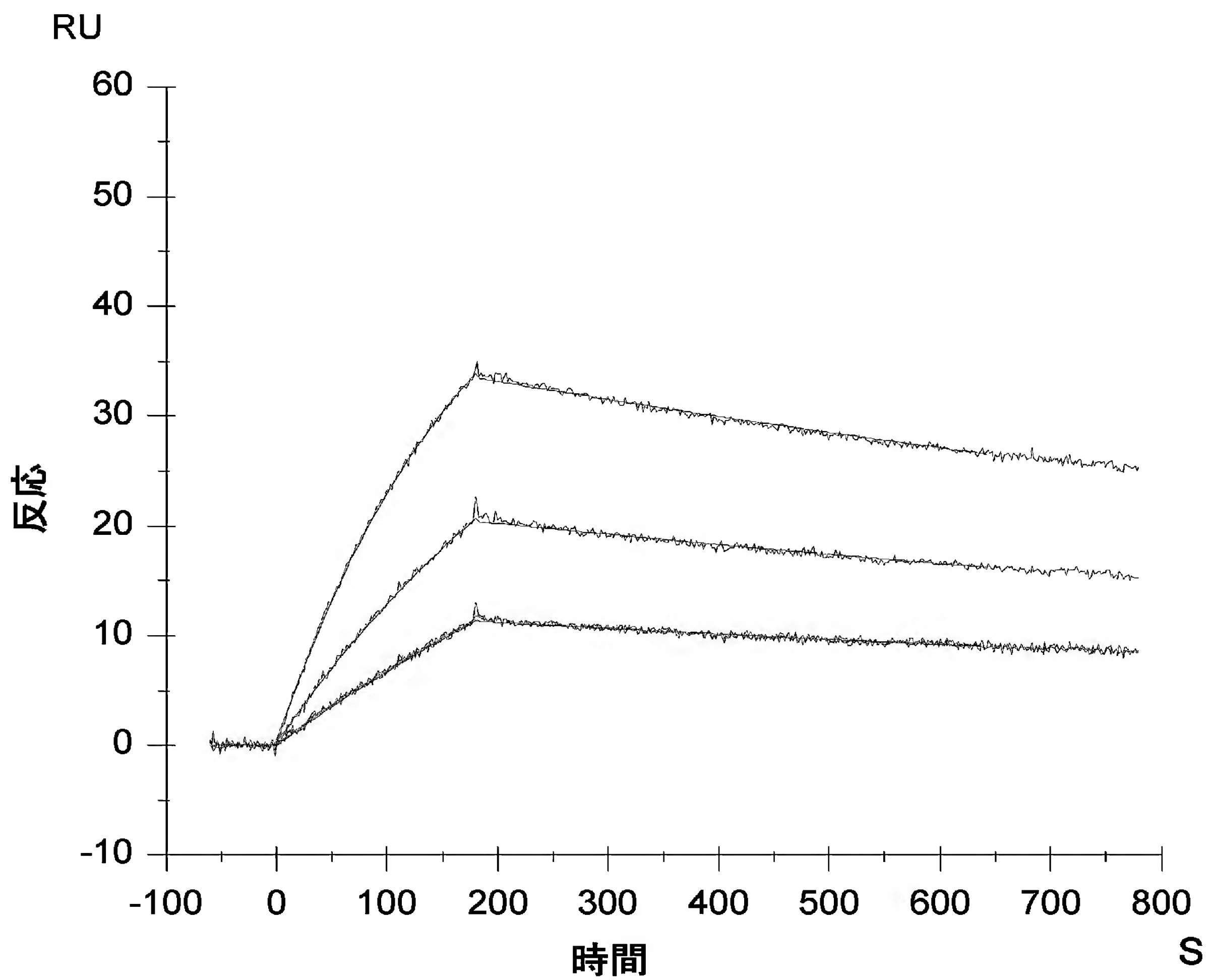
[図11]



[図12]



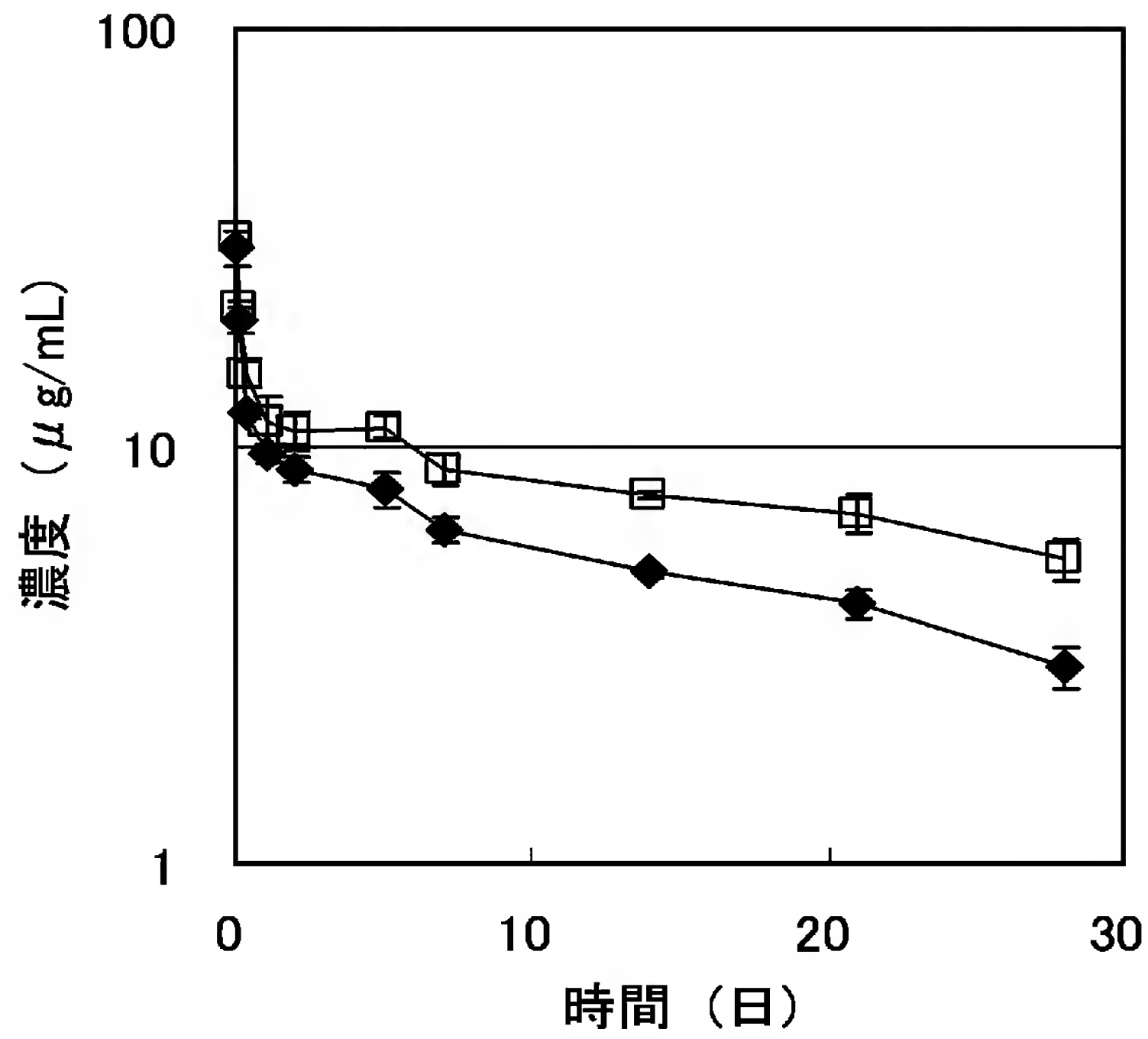
[図13]



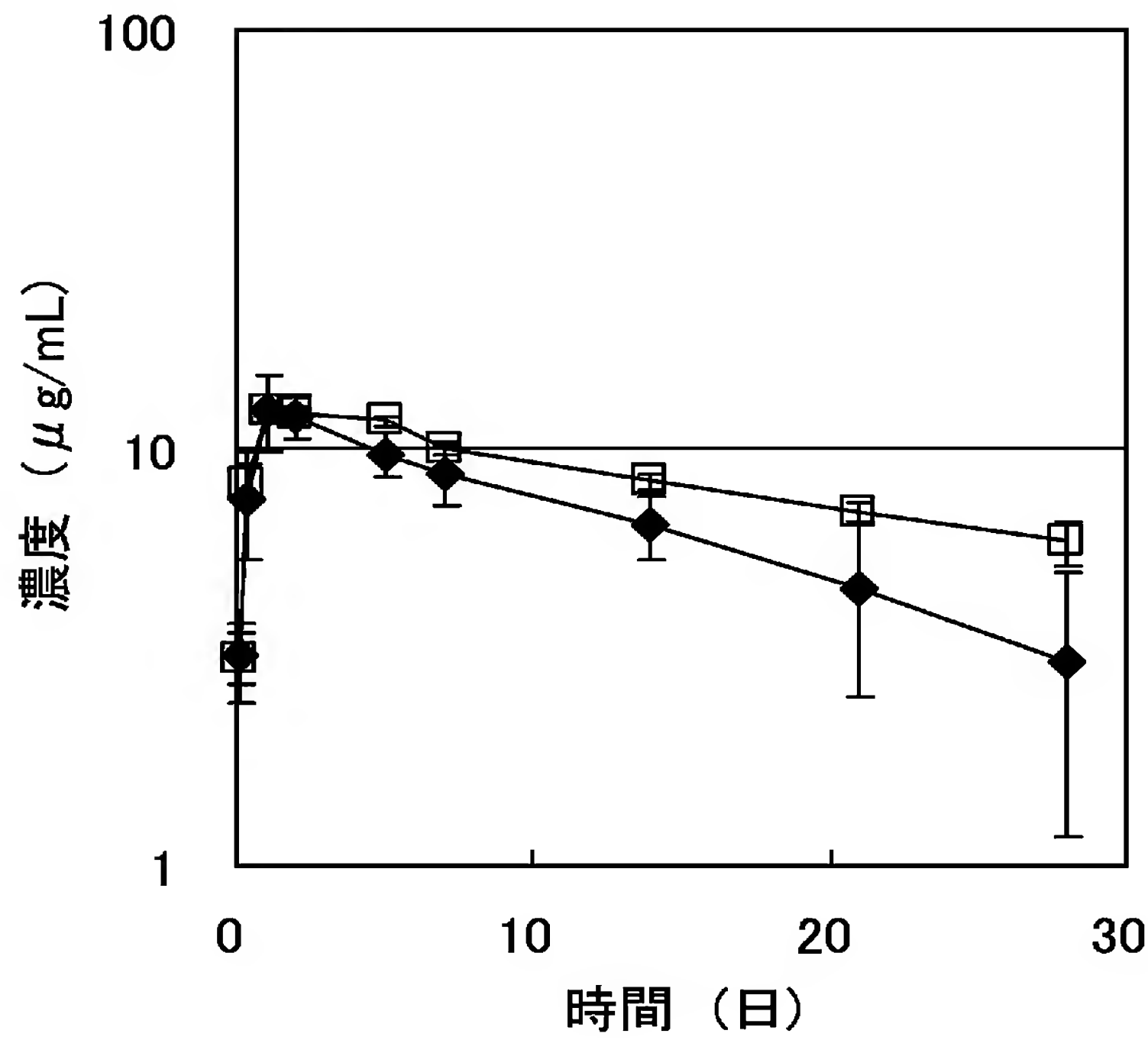
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

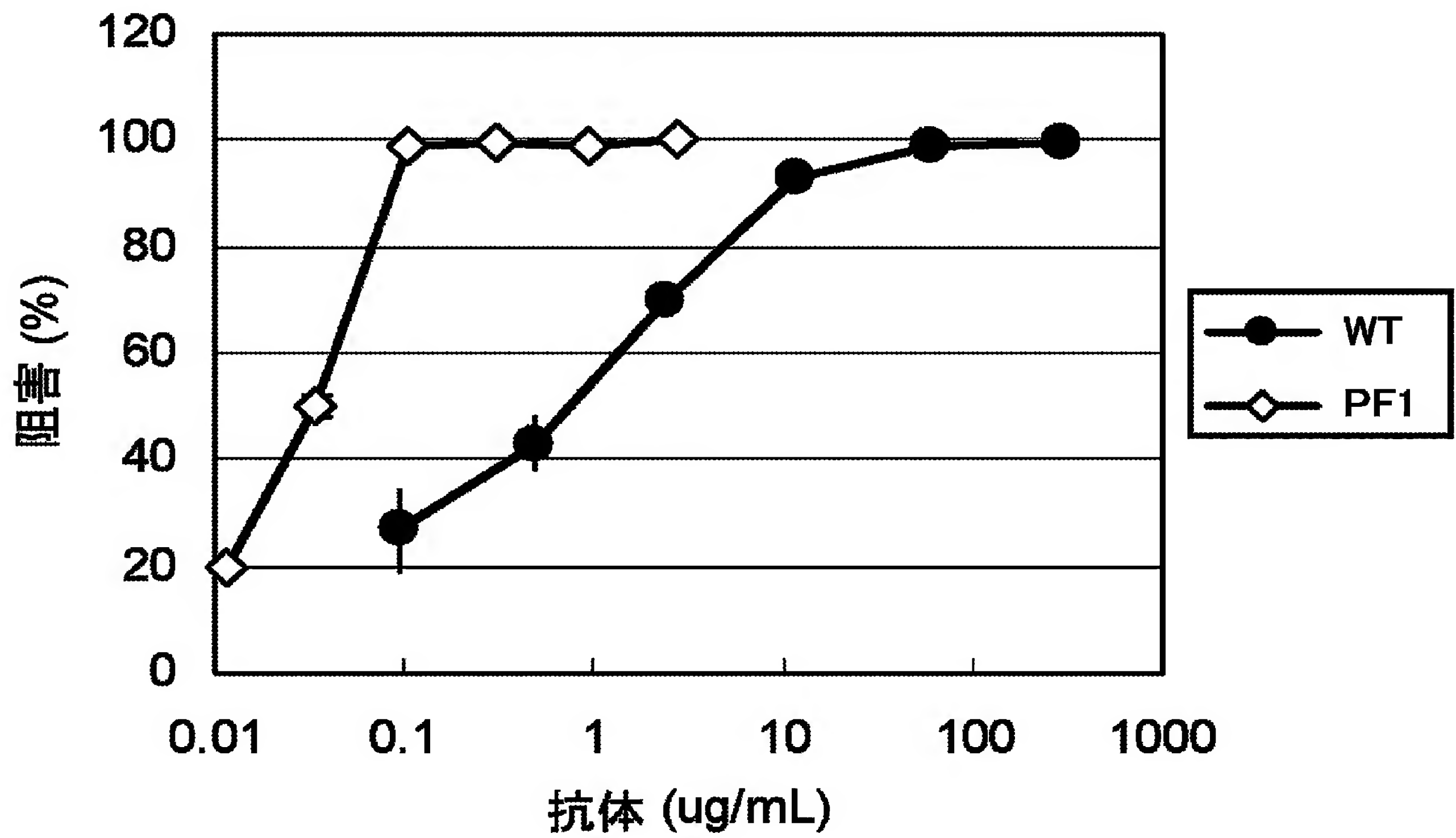
[図14]



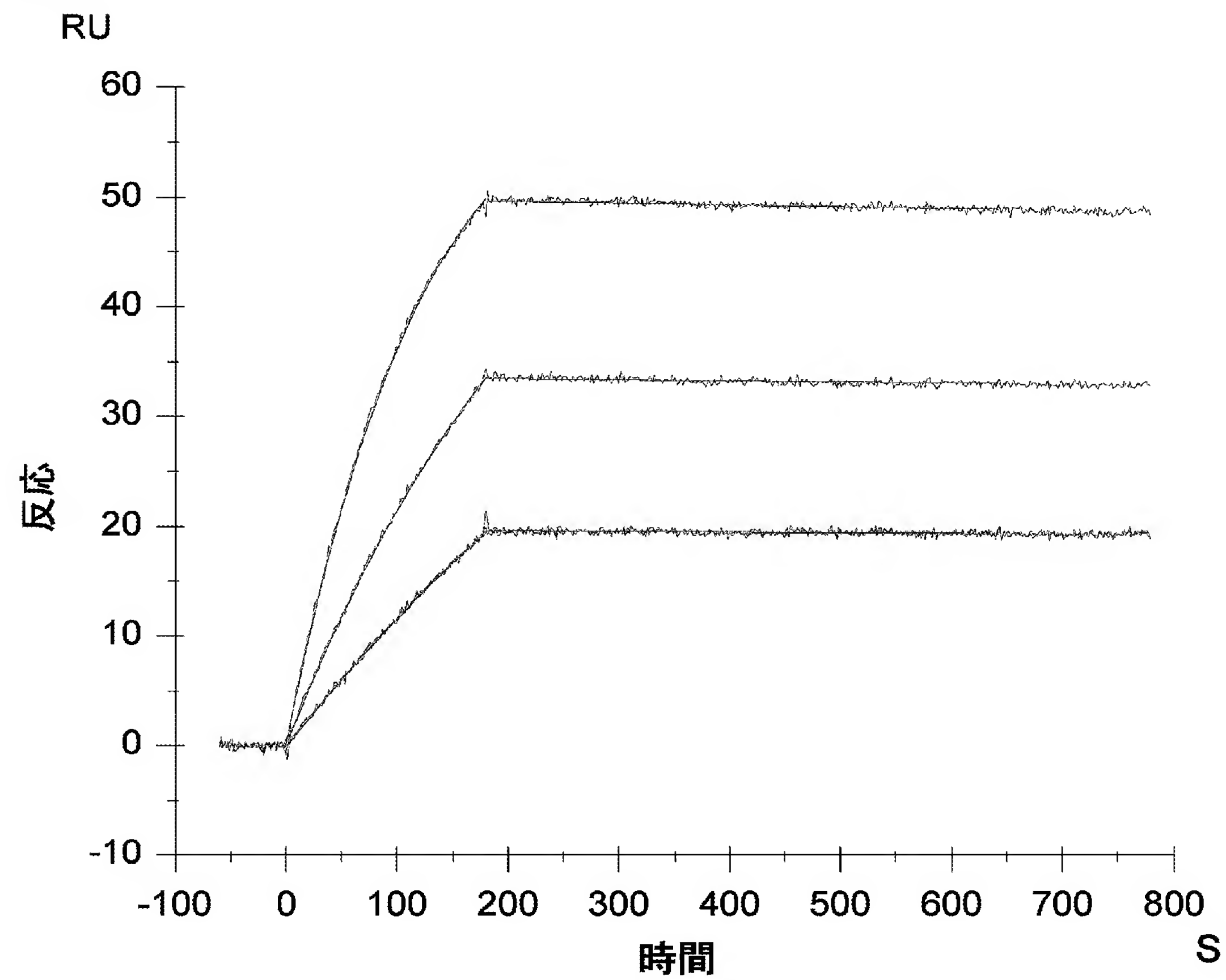
[図15]



[図16]



[図17]

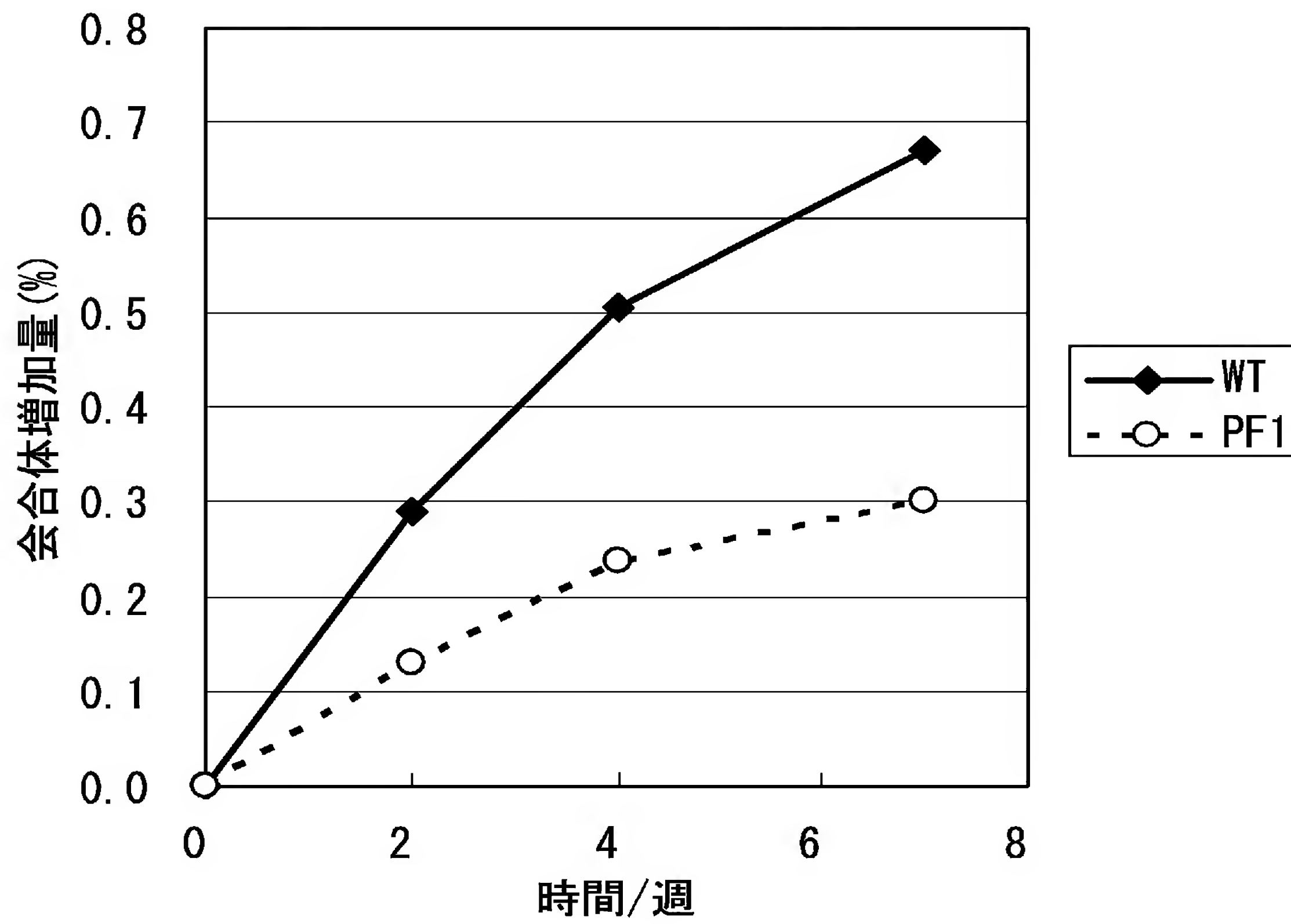




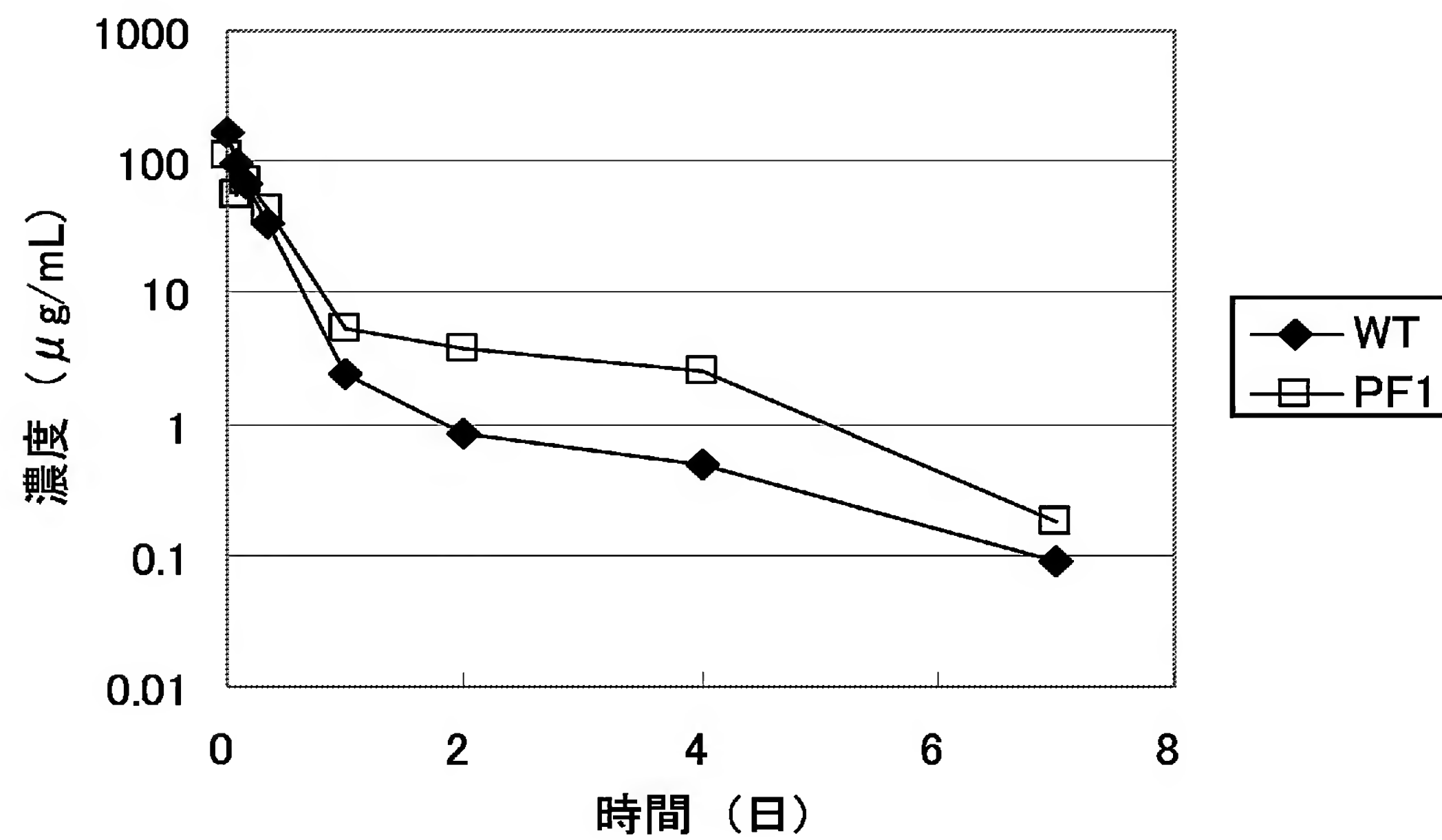
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

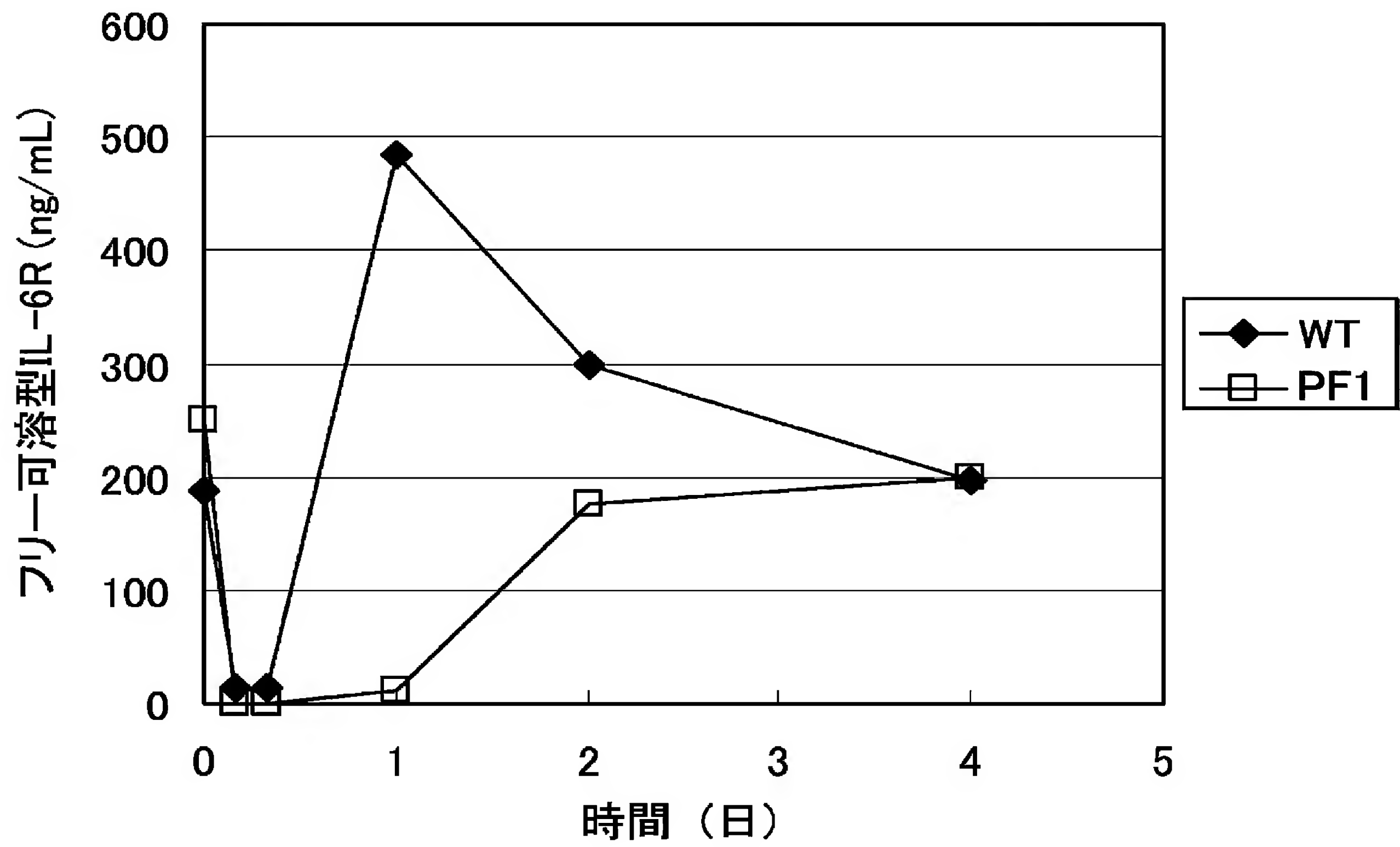
[図18]



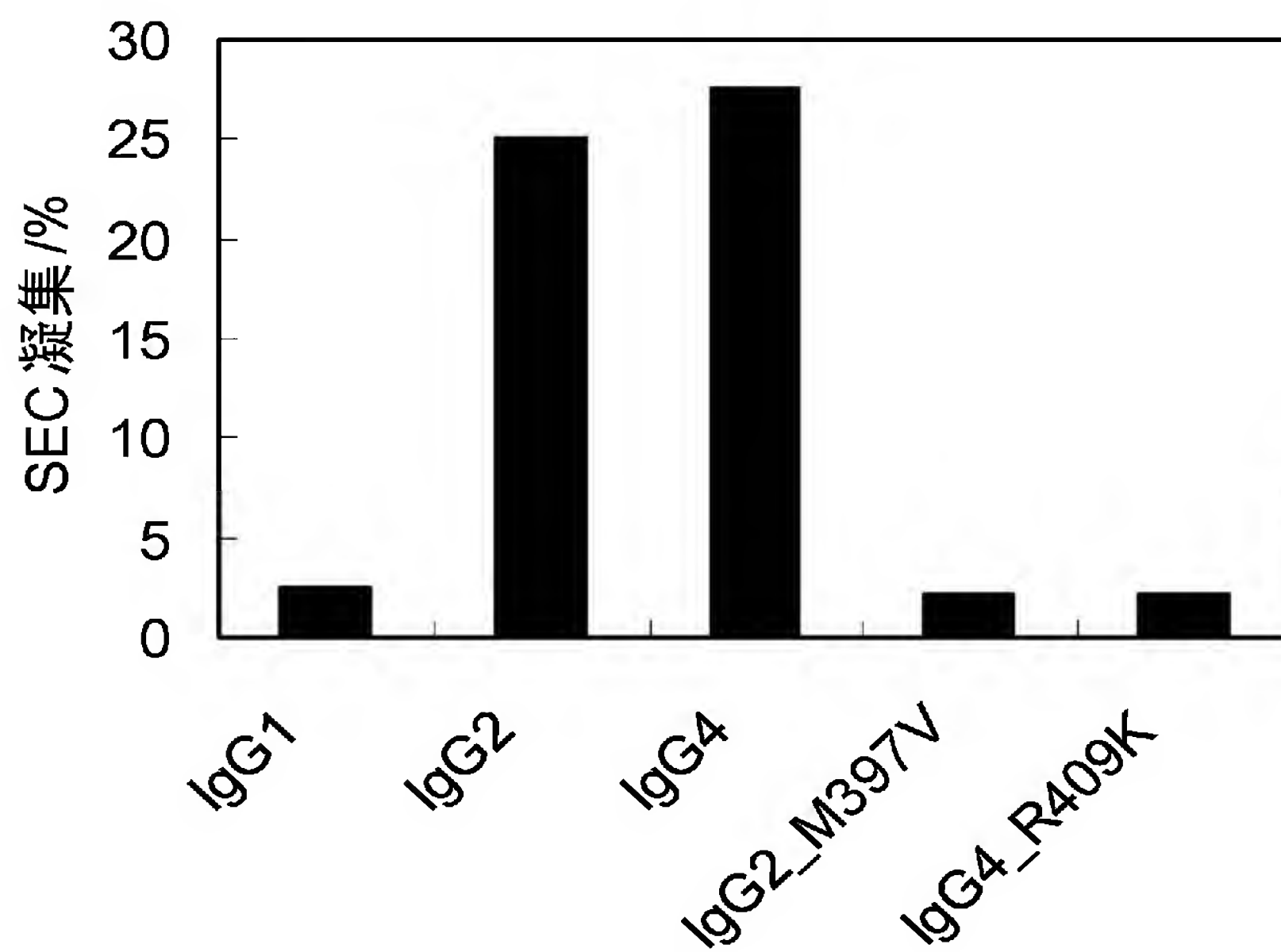
[図19]



[図20]



[図21]



WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

[図22]

2487チャンネル1

WT-IgG1

2487チャンネル1

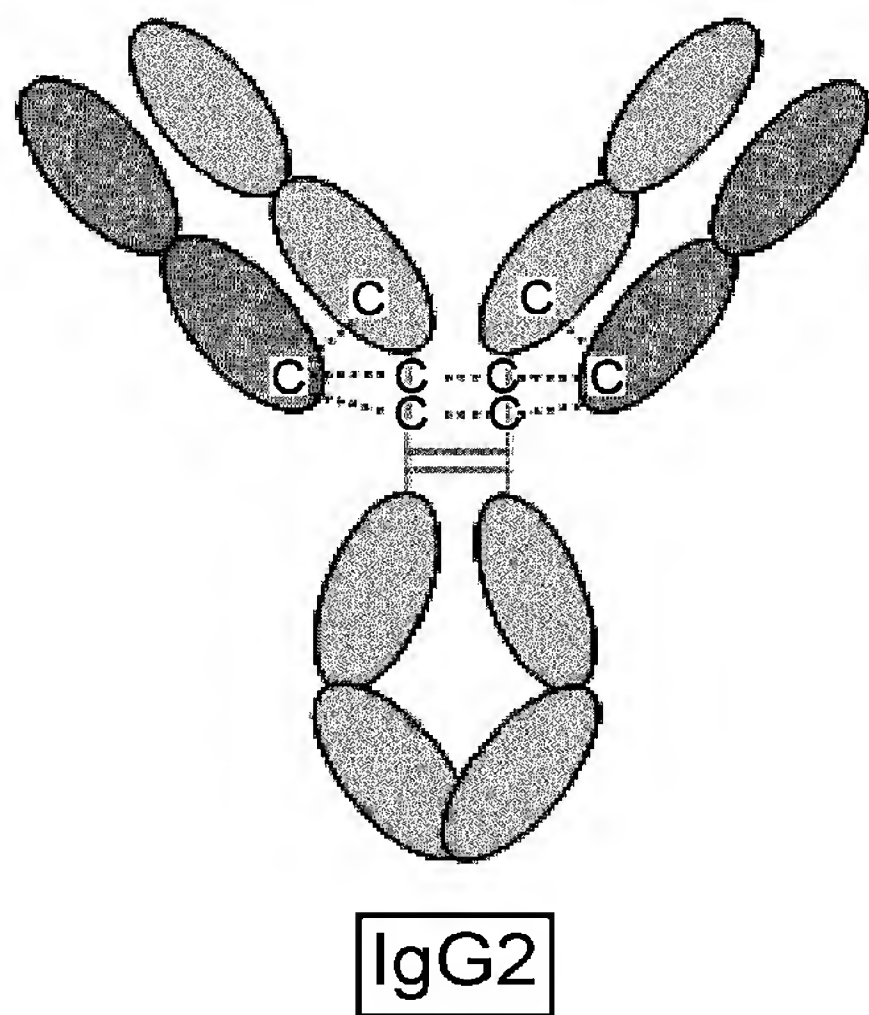
WT-IgG2

2487チャンネル1

WT-IgG4

10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00 40.00 45.00 50.00 55.00 60.00 65.00 70.00  
分

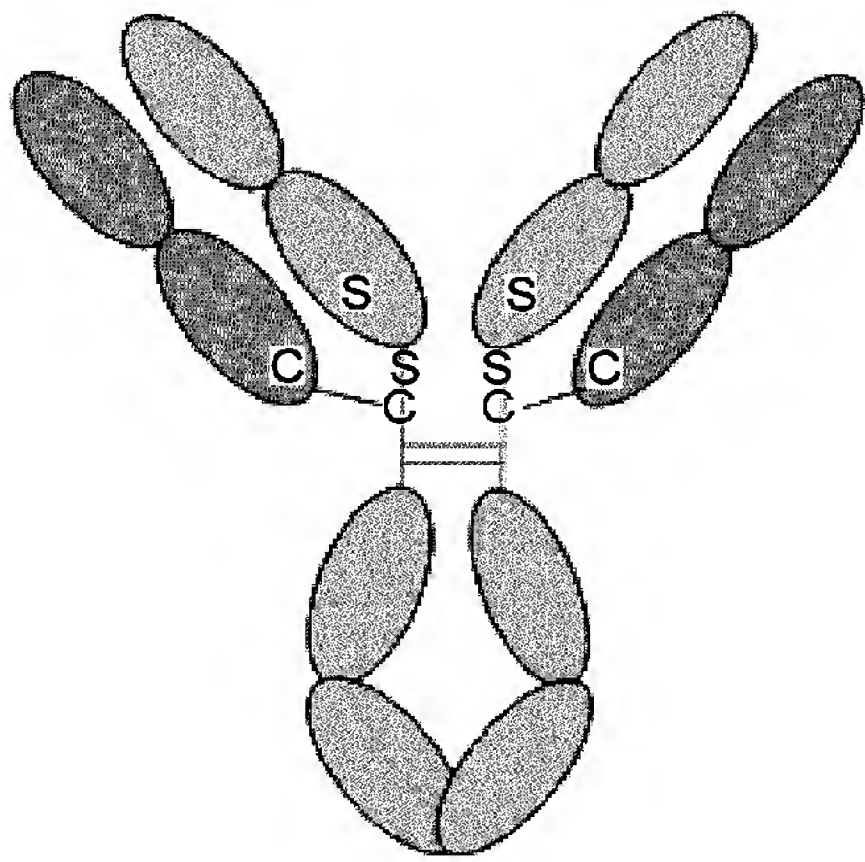
[図23]



WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

[図24]



IgG2\_SKSC

[図25]

2487チャンネル1

IgG2-SKSC

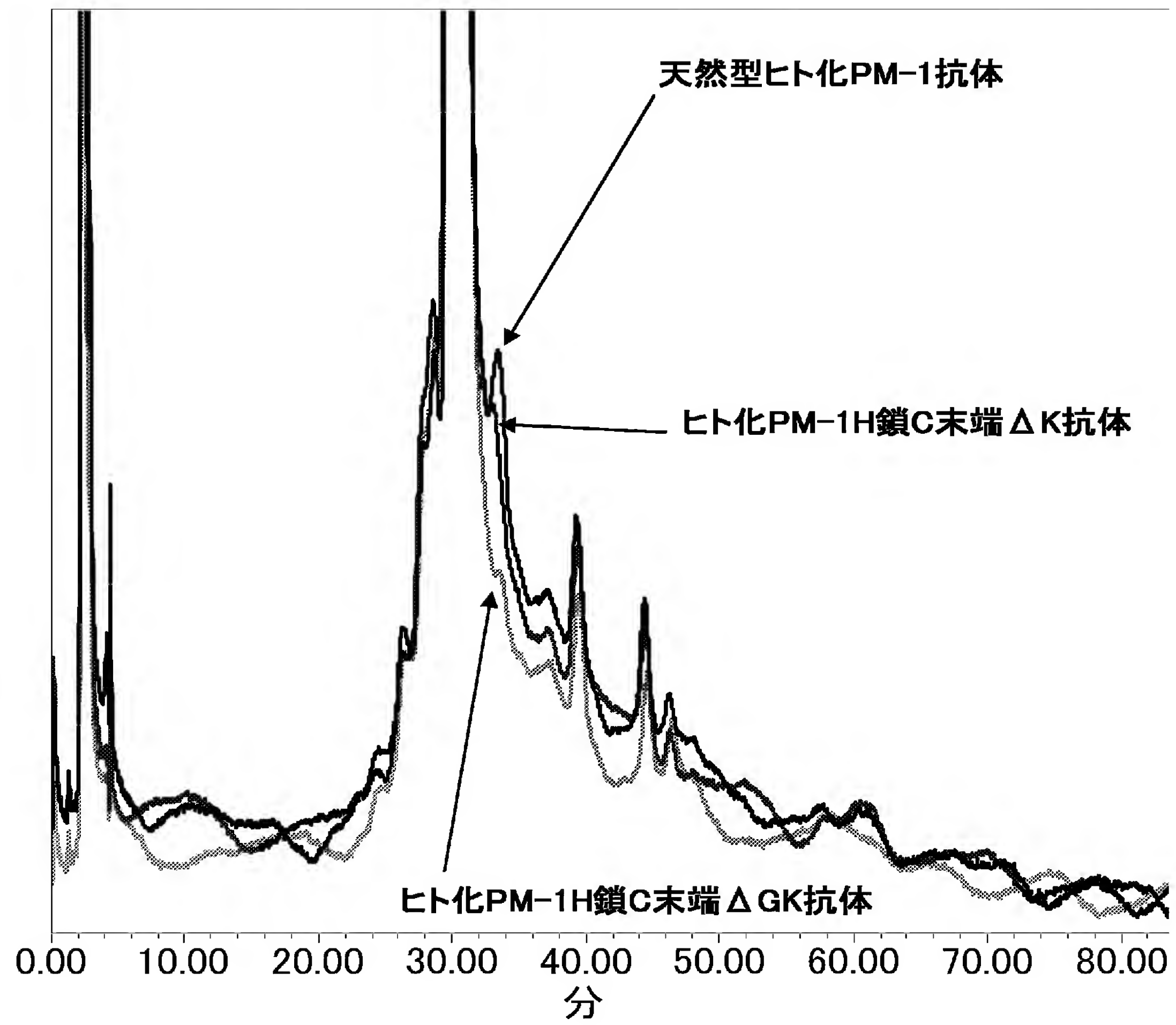
2487チャンネル1

WT-IgG2

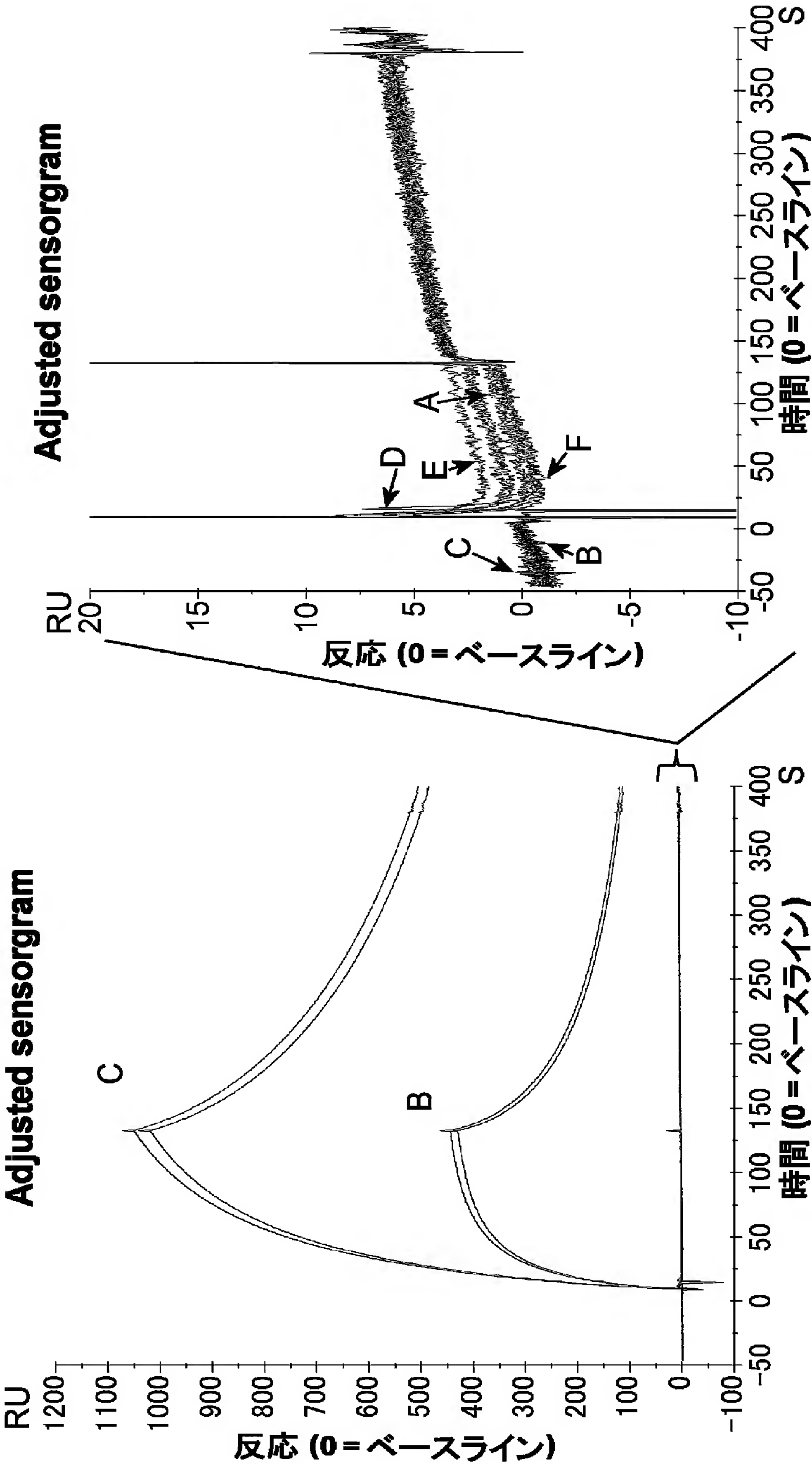
10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00 40.00 45.00 50.00 55.00 60.00 65.00 70.00  
分



[図26]

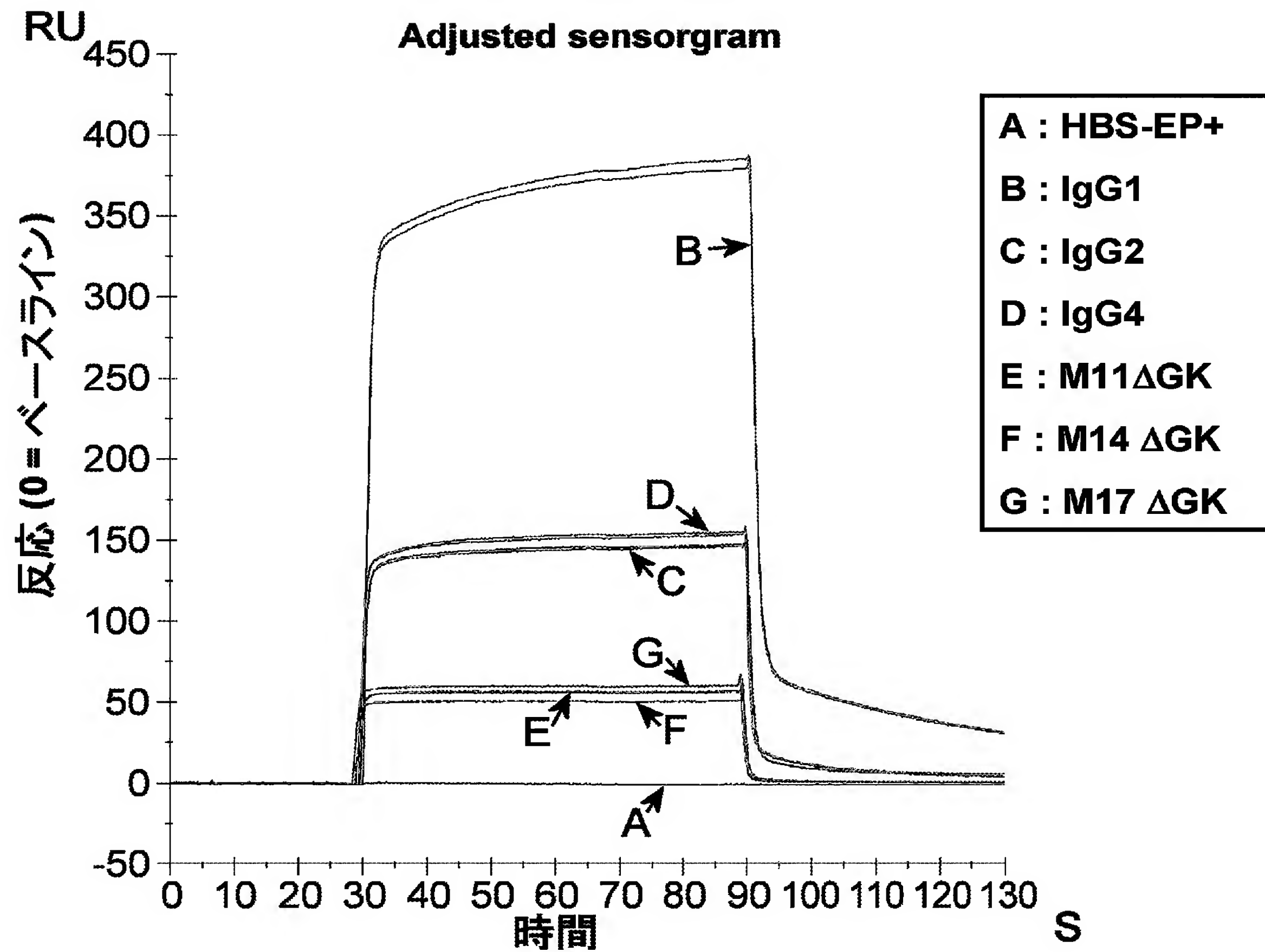


[図27]

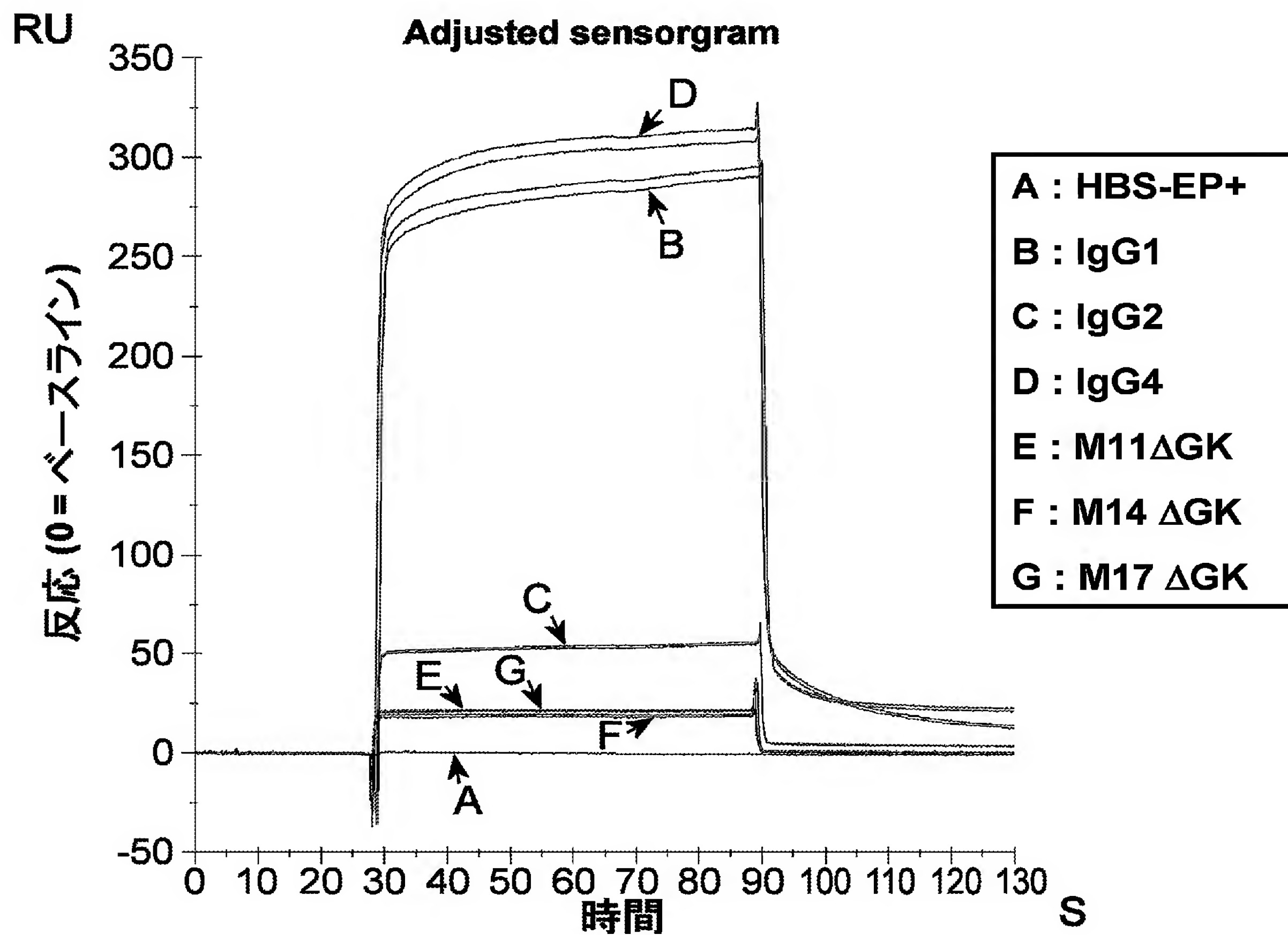


A: M14ΔGK B: IgG4 C: IgG1 D:M11ΔGK E: IgG2 F: M17ΔGK

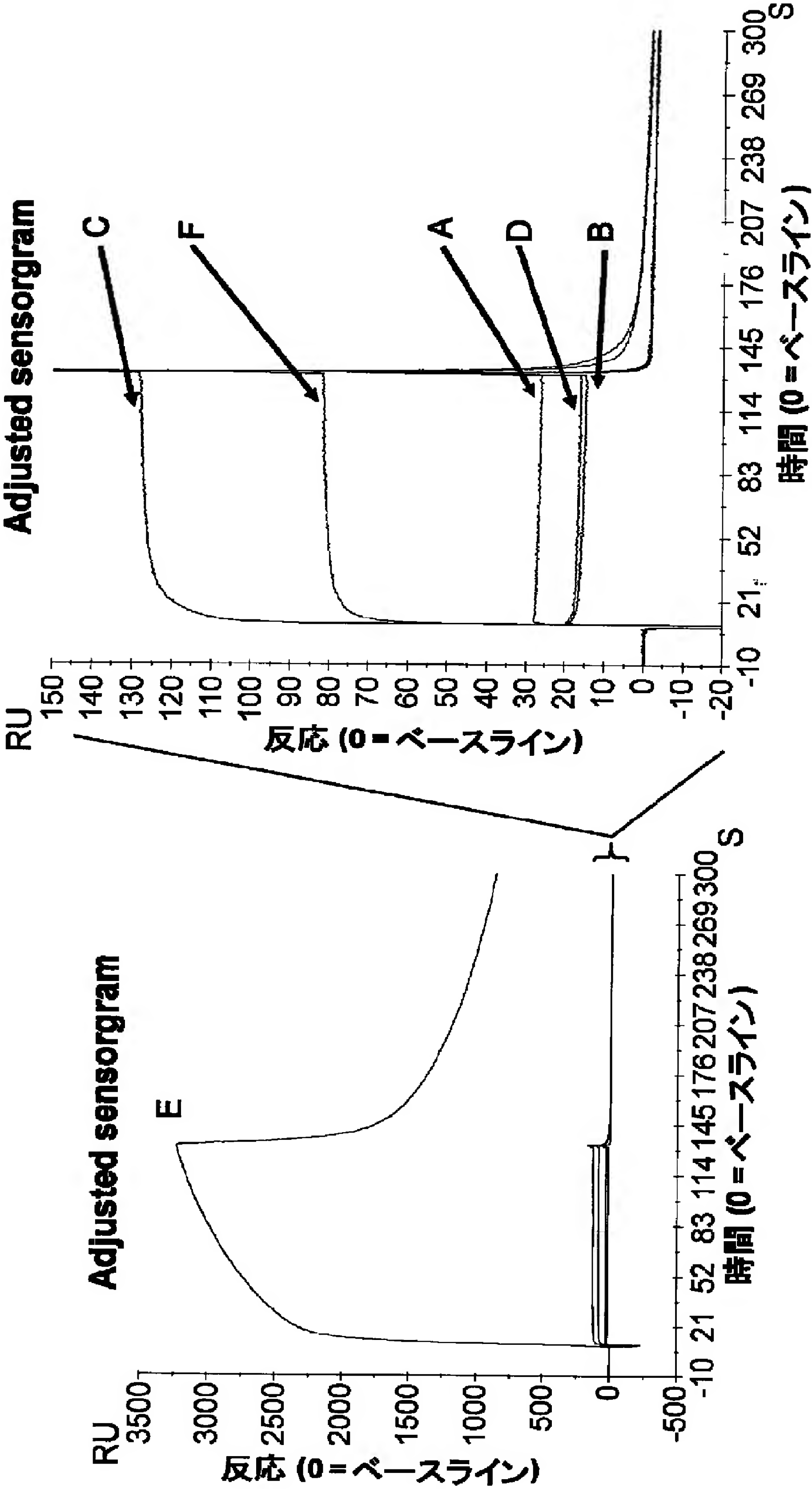
[図28]



[図29]



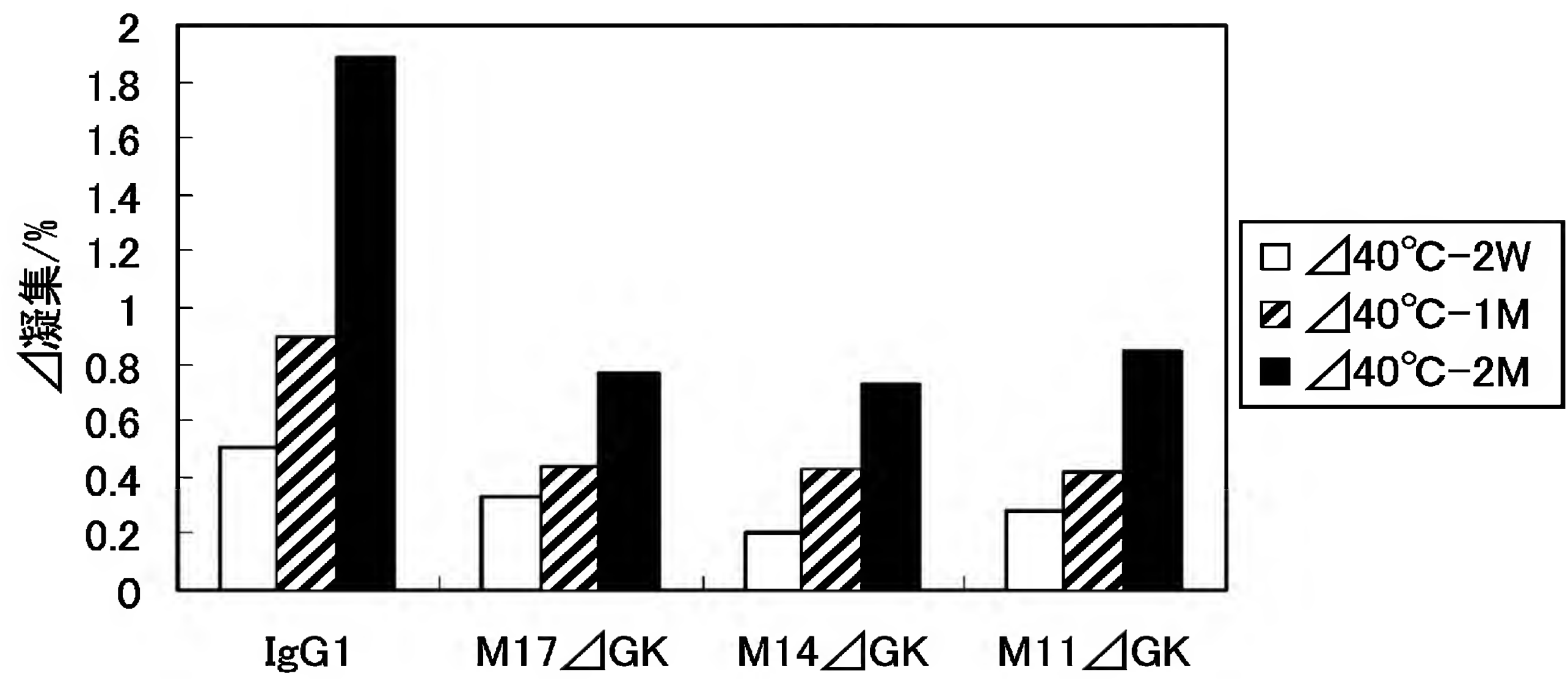
[図30]



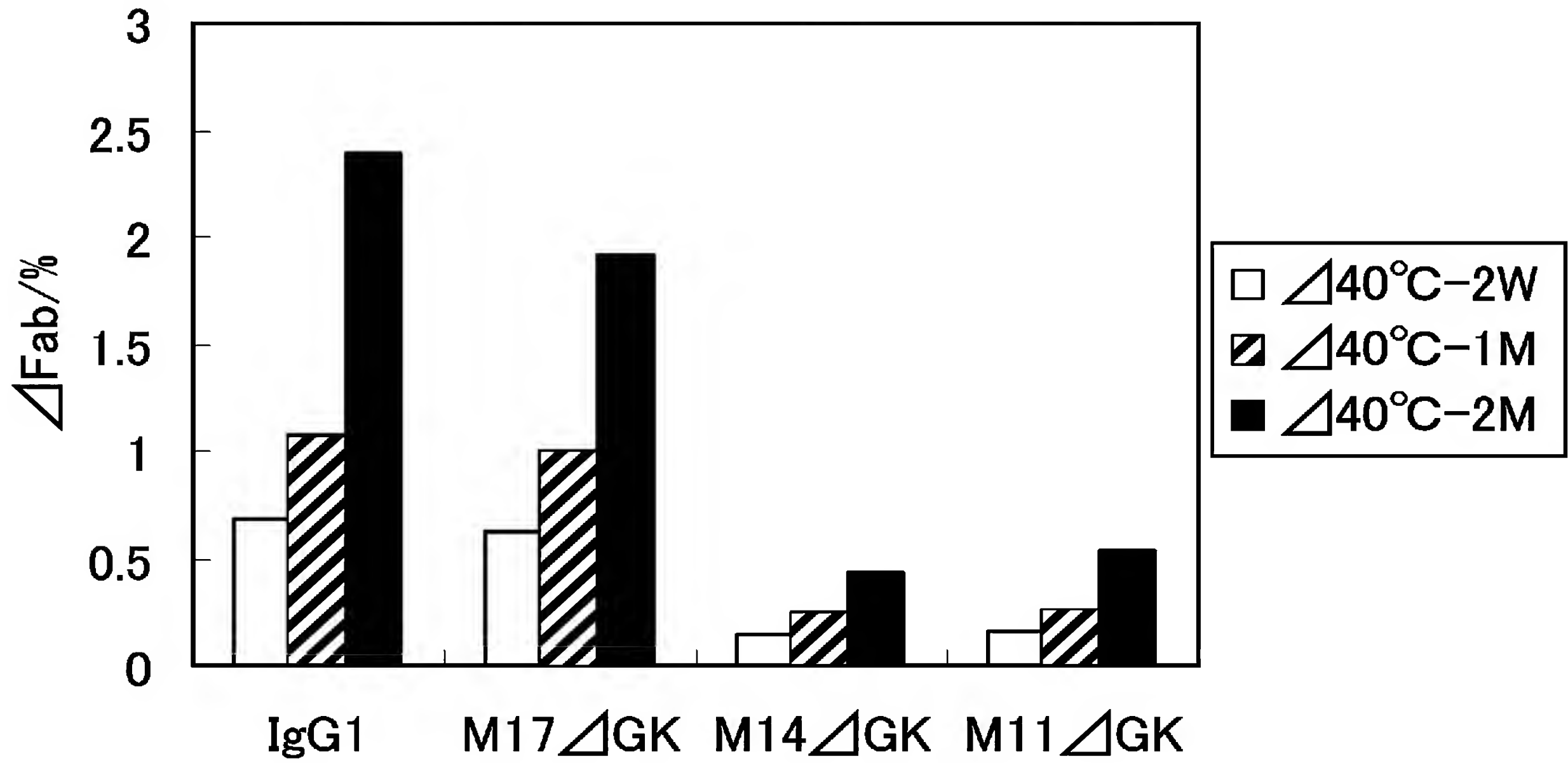
A: M17ΔGK B: M11ΔGK C: IgG4 D: M14ΔGK E: IgG1 F: IgG2



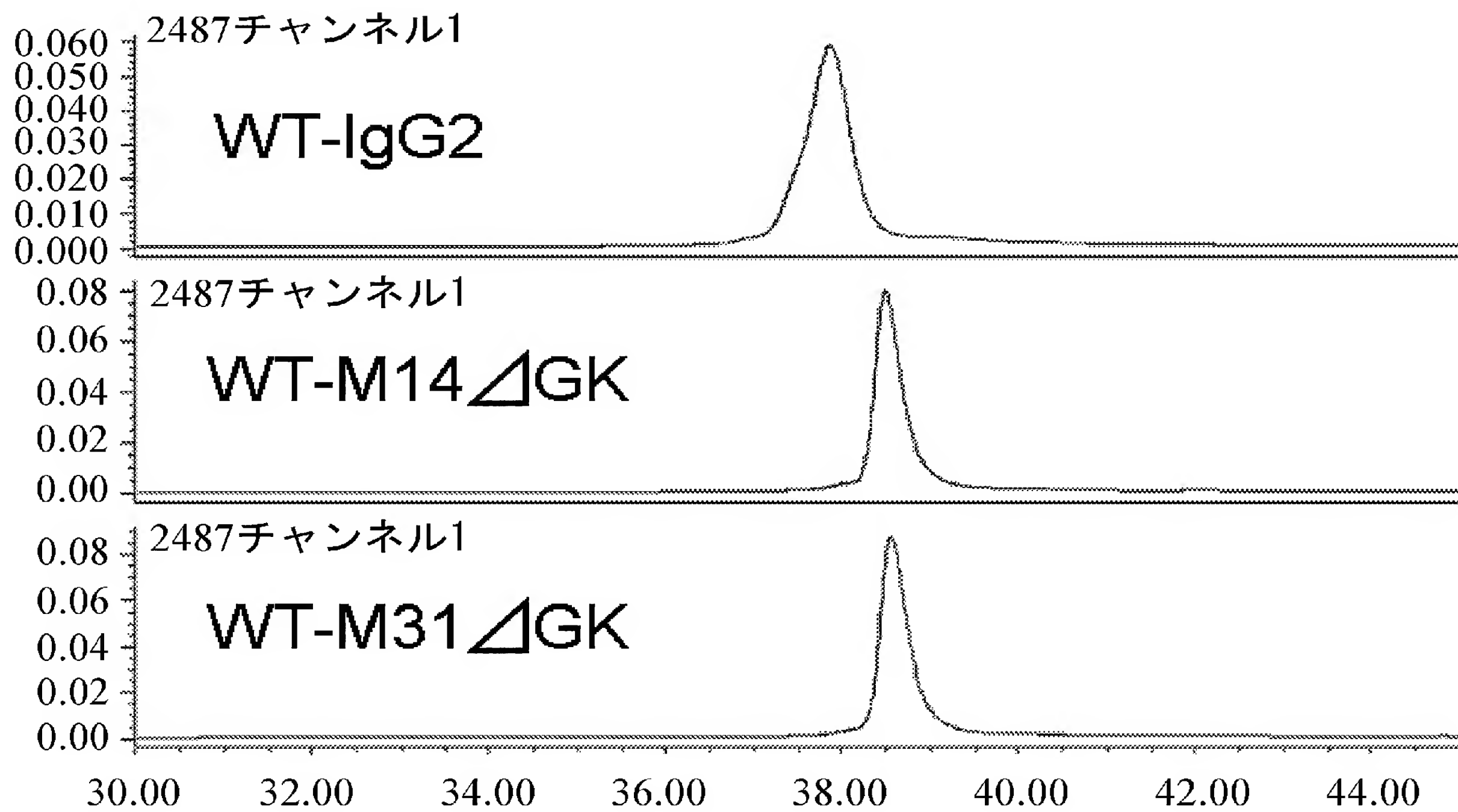
[図31]



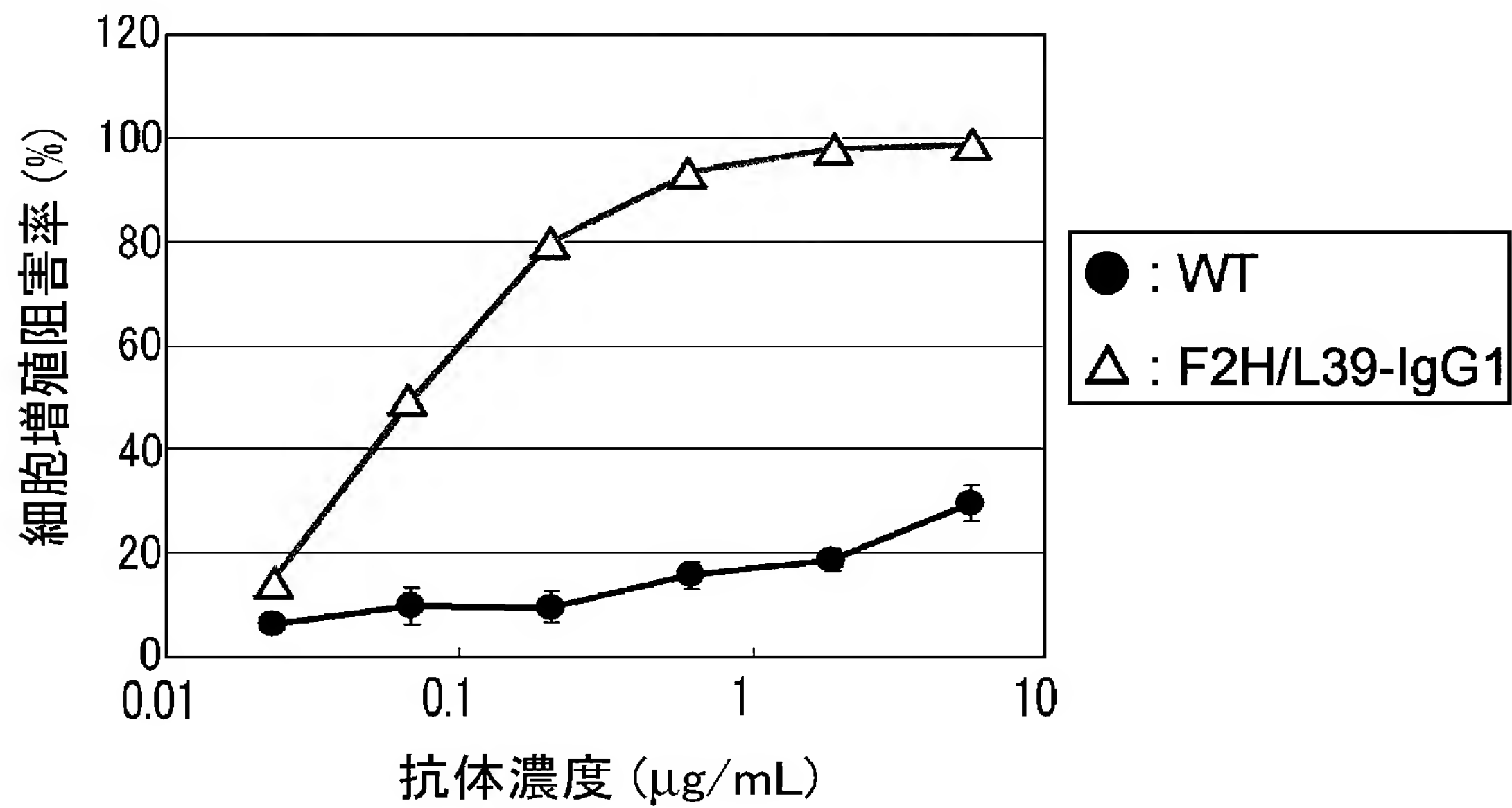
[図32]



[図33]



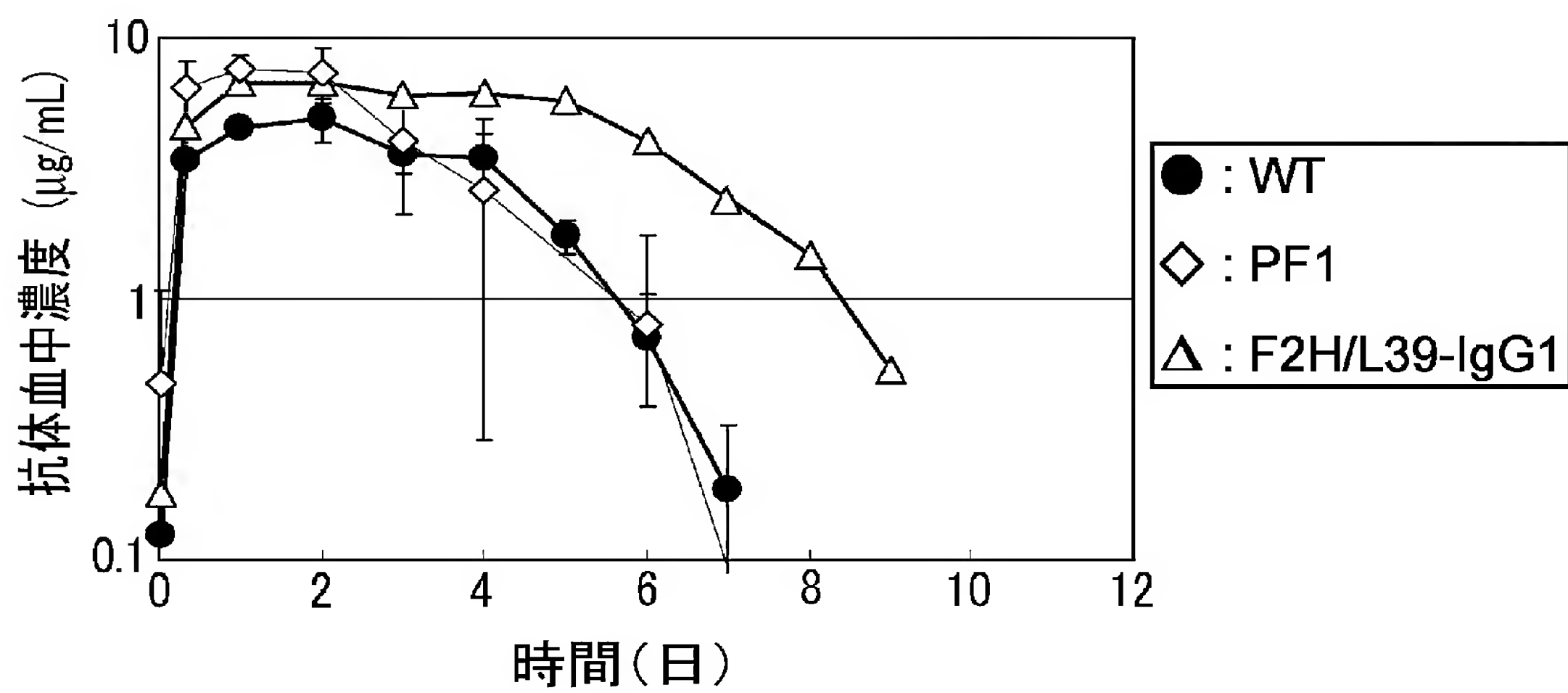
[図34]



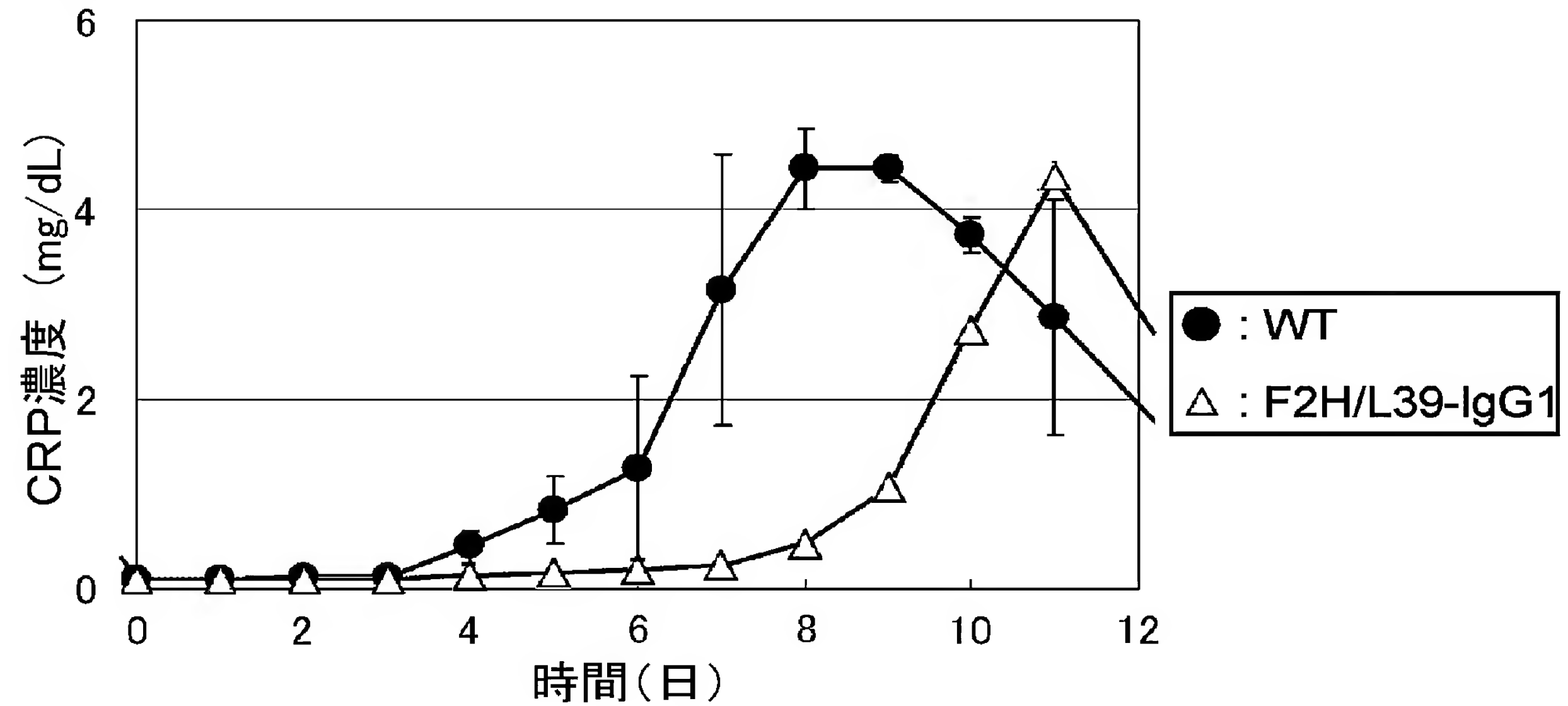
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

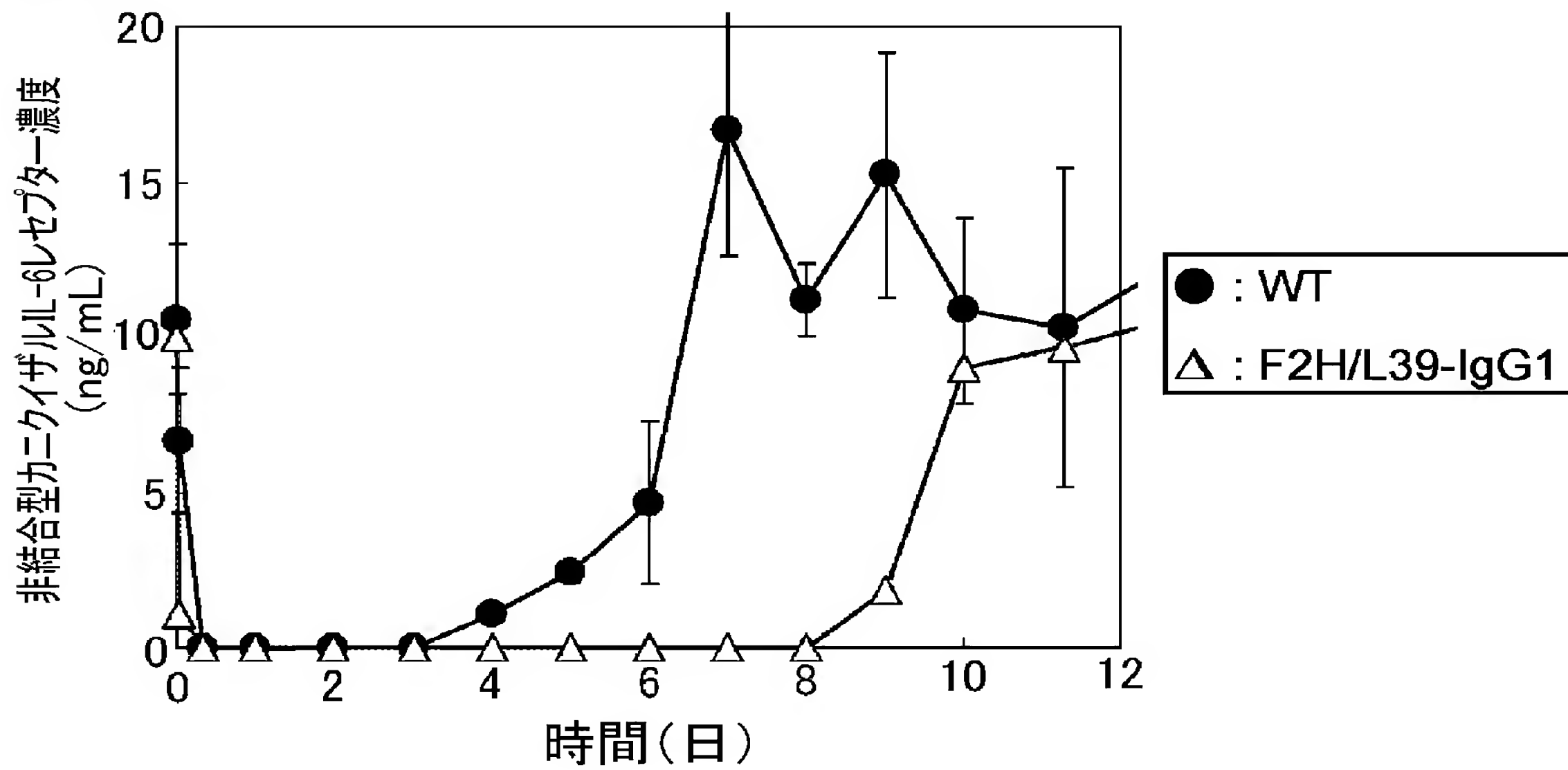
[図35]



[図36]



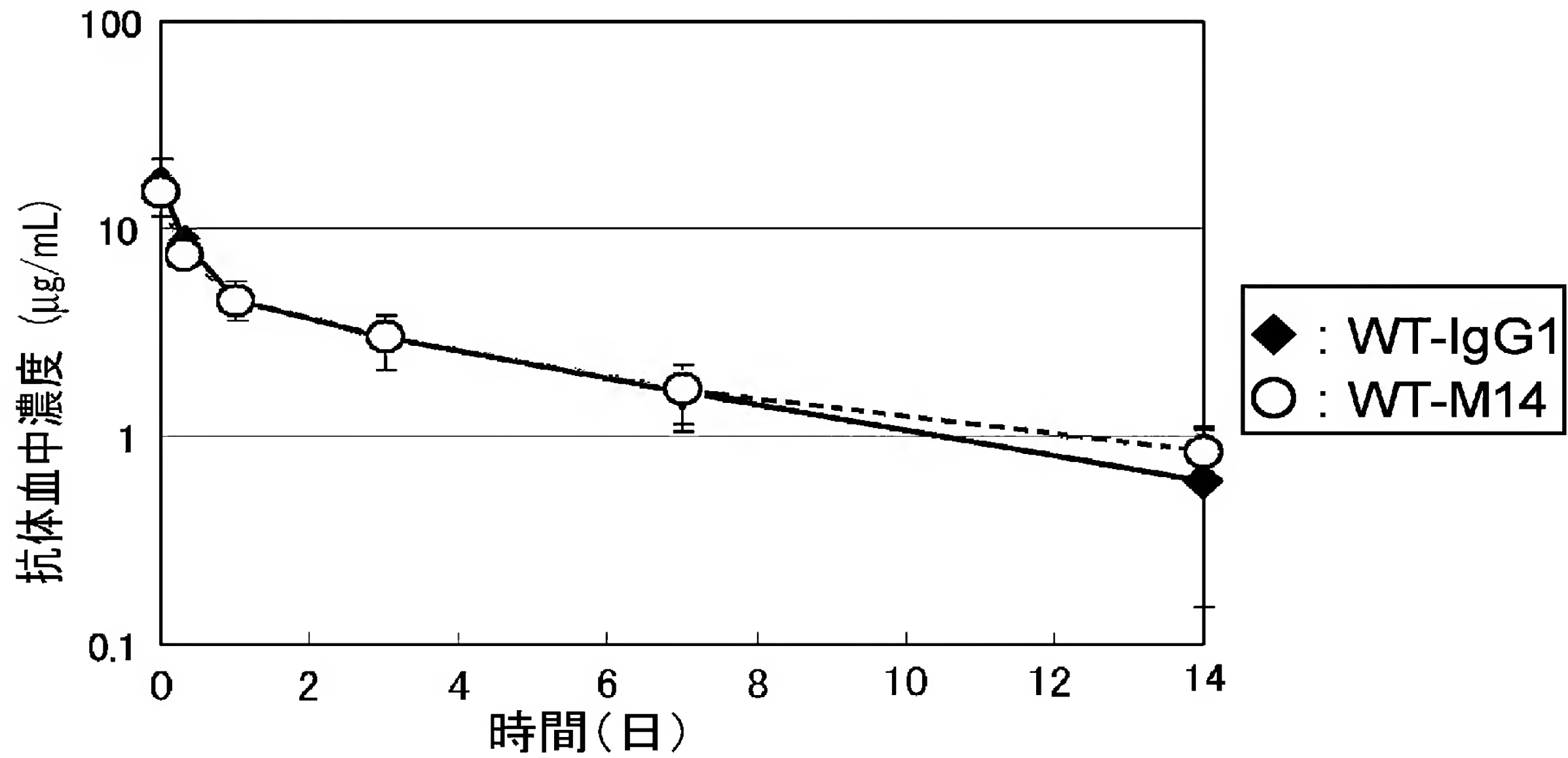
[図37]



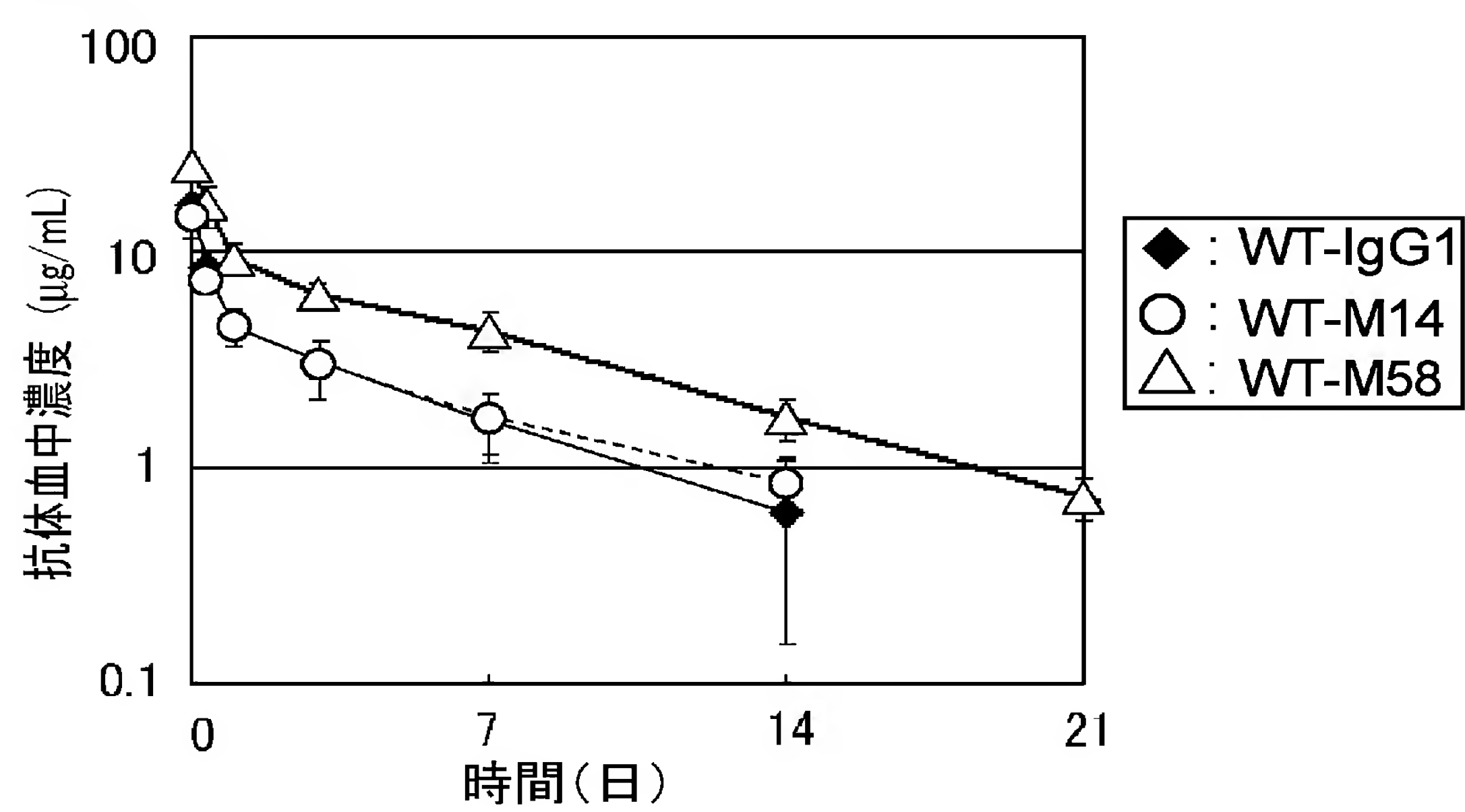
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

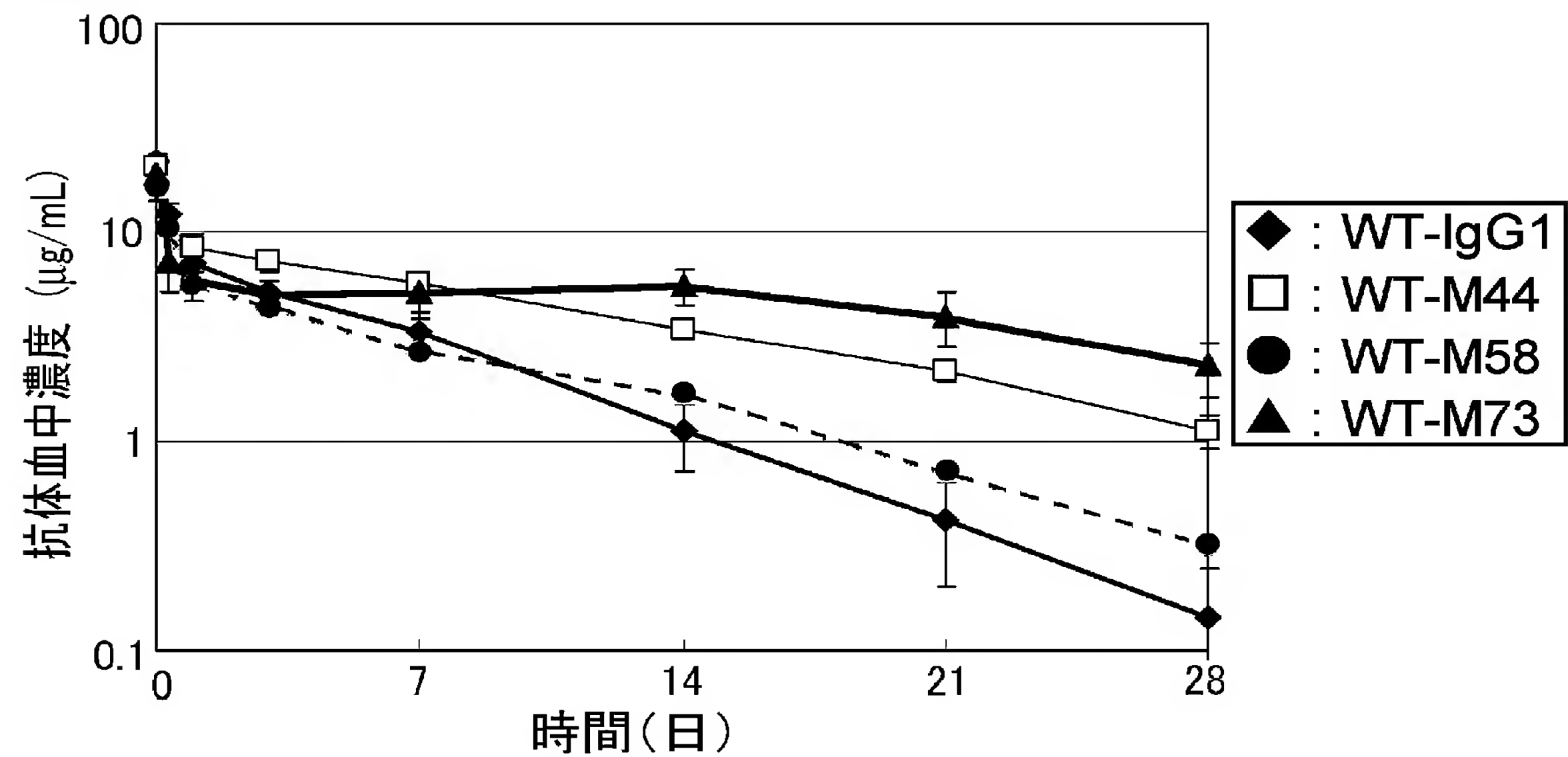
[図38]



[図39]



[図40]

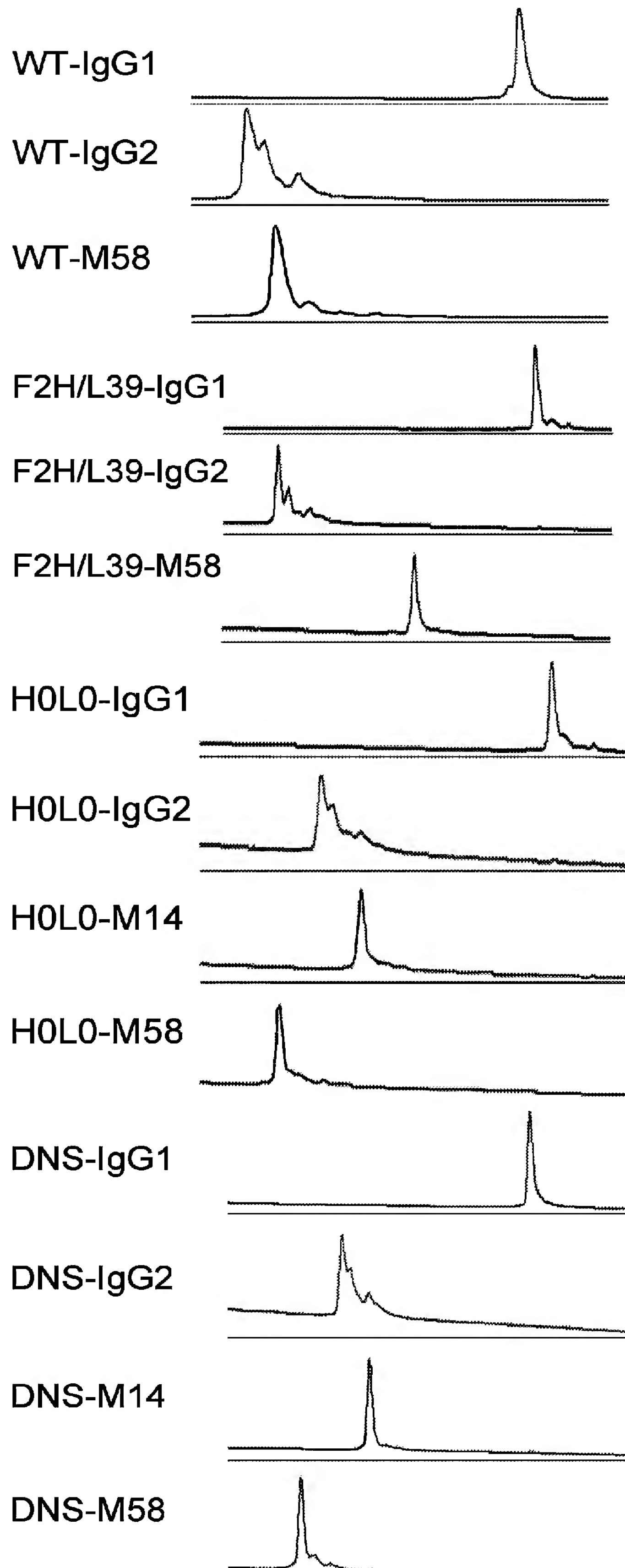




WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

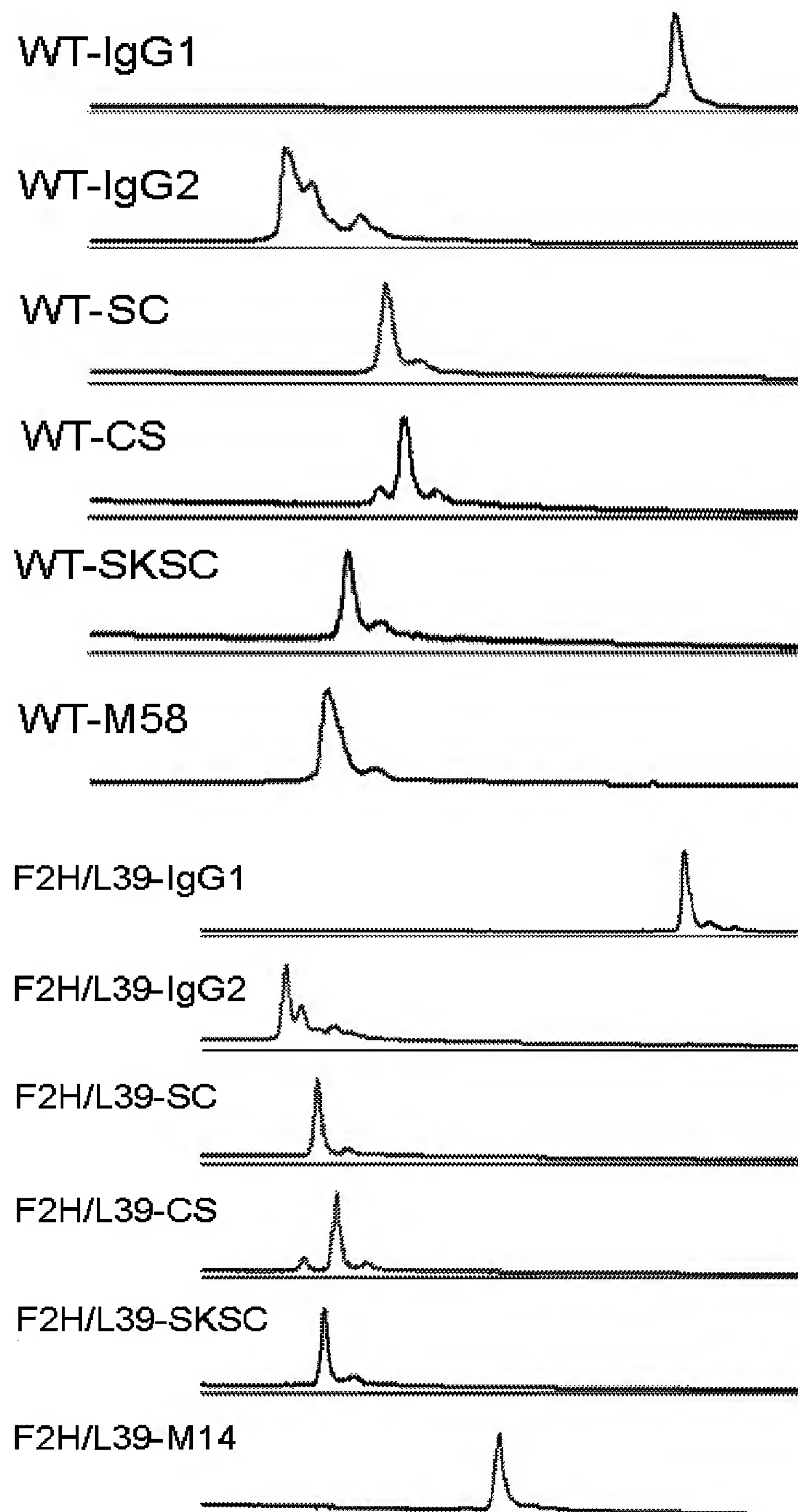
[図41]



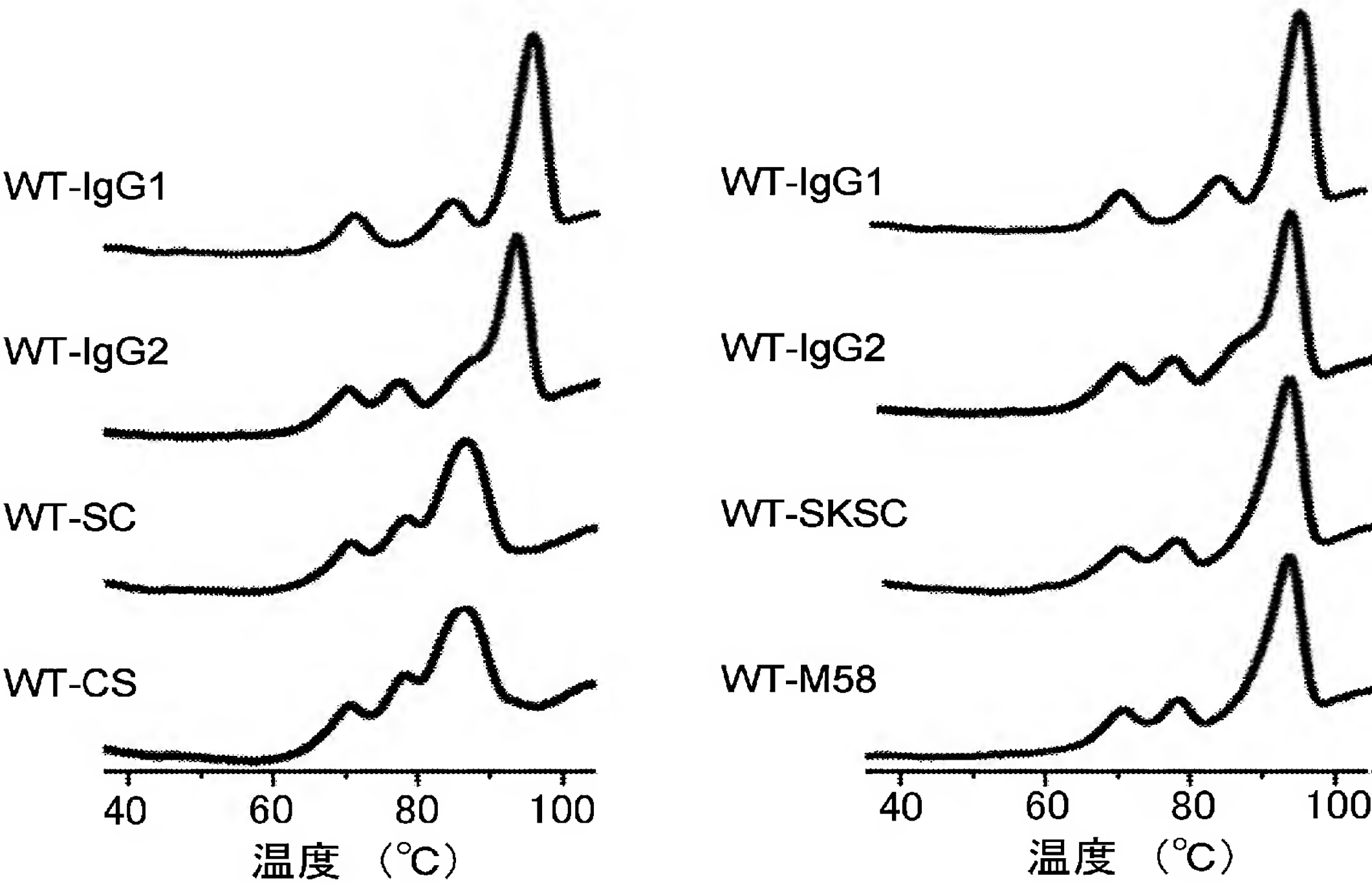
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

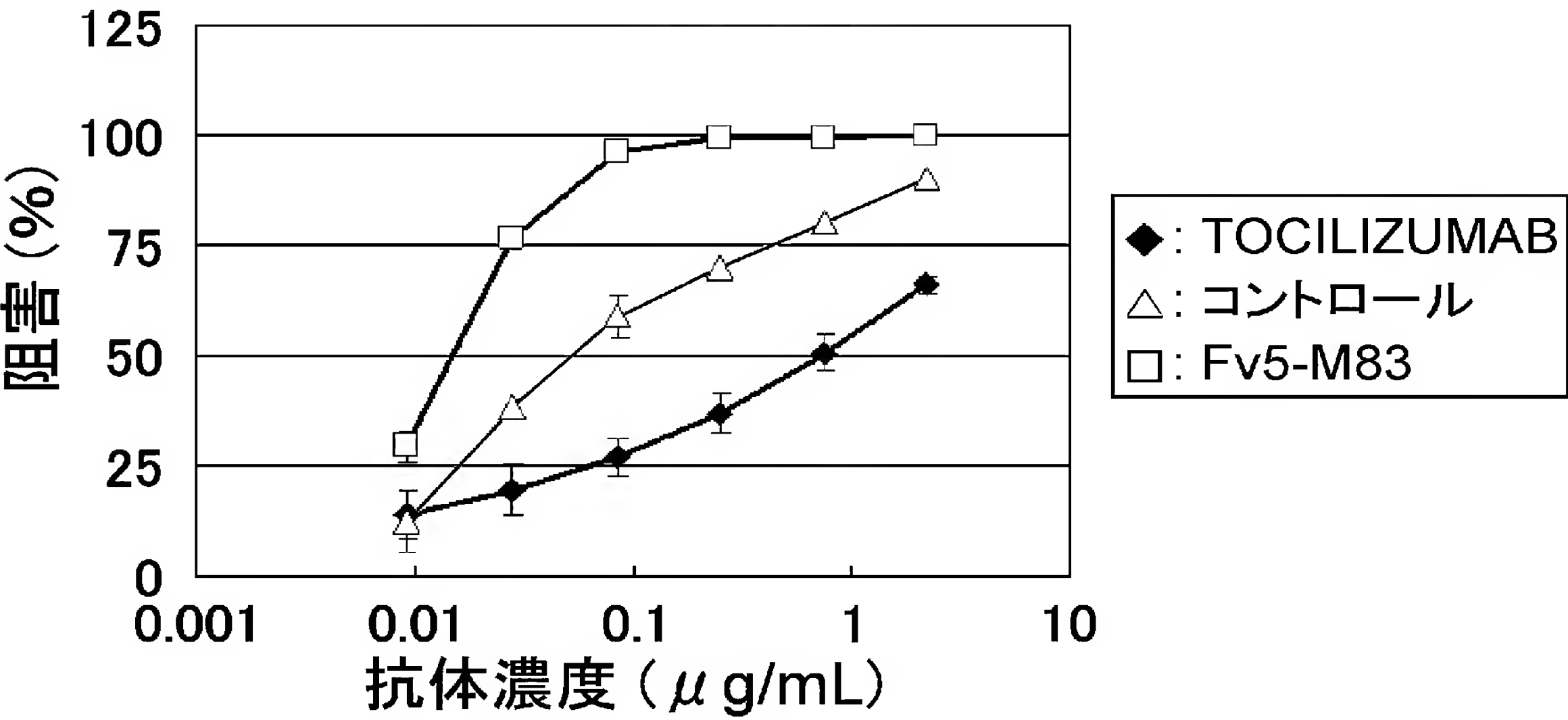
[図42]



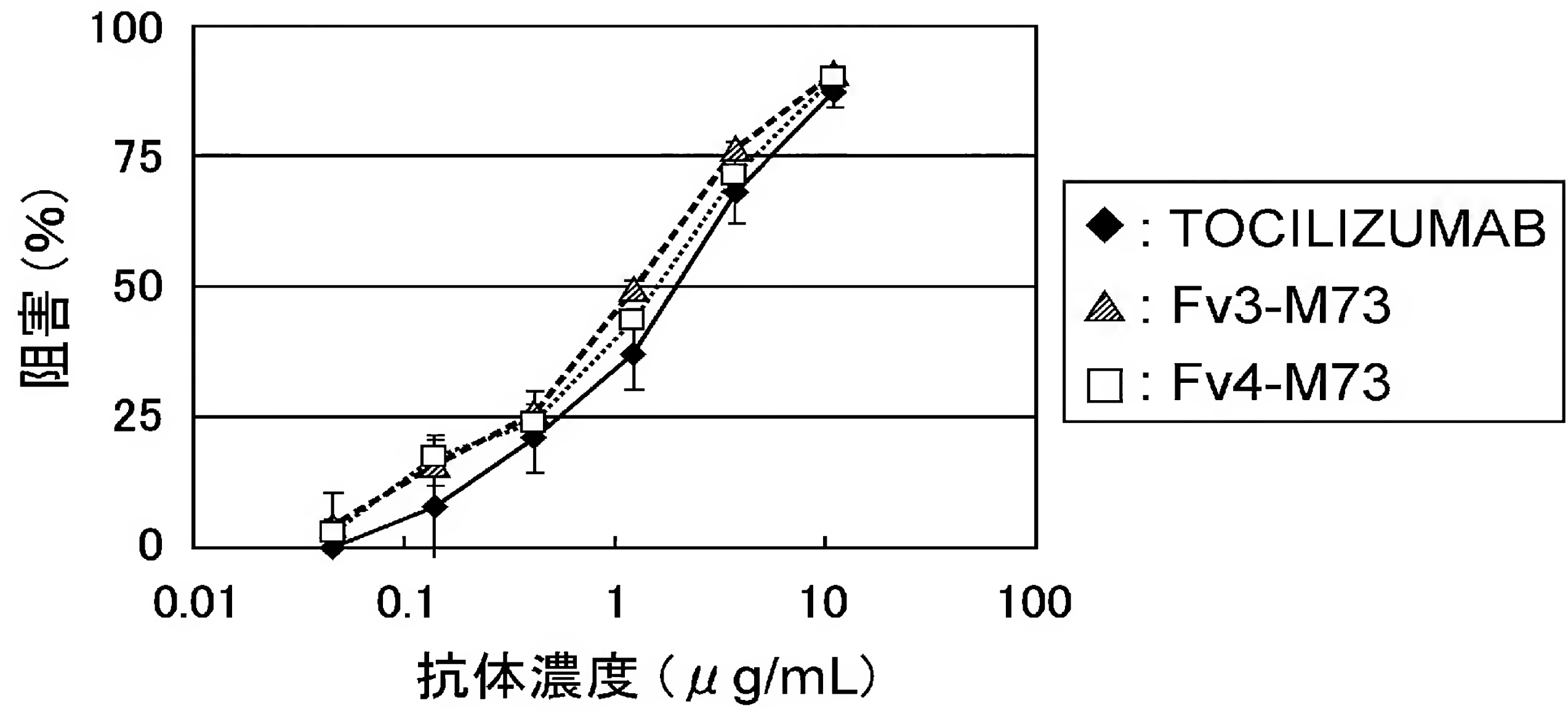
[図43]



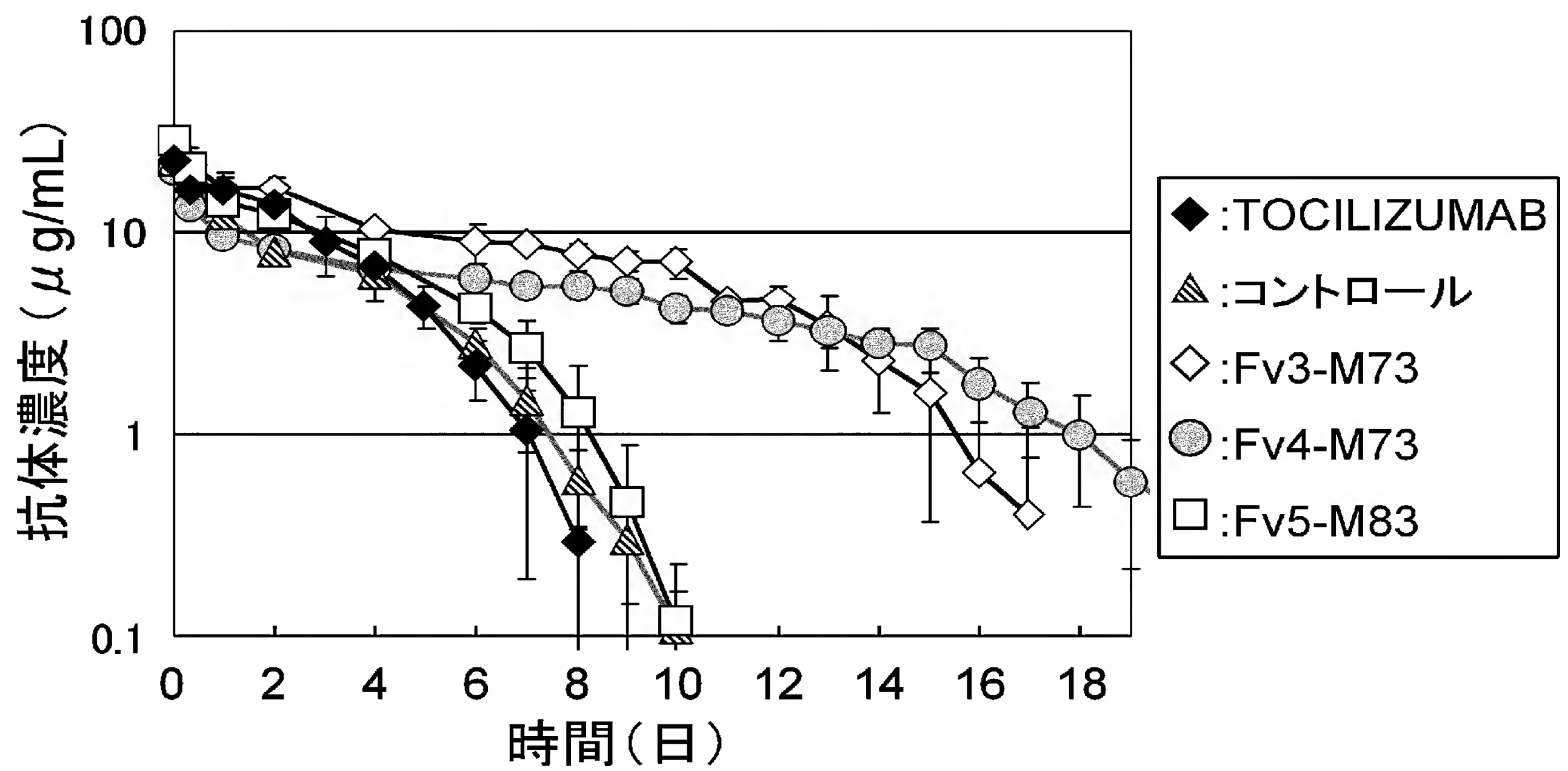
[図44]



[図45]



[図46]

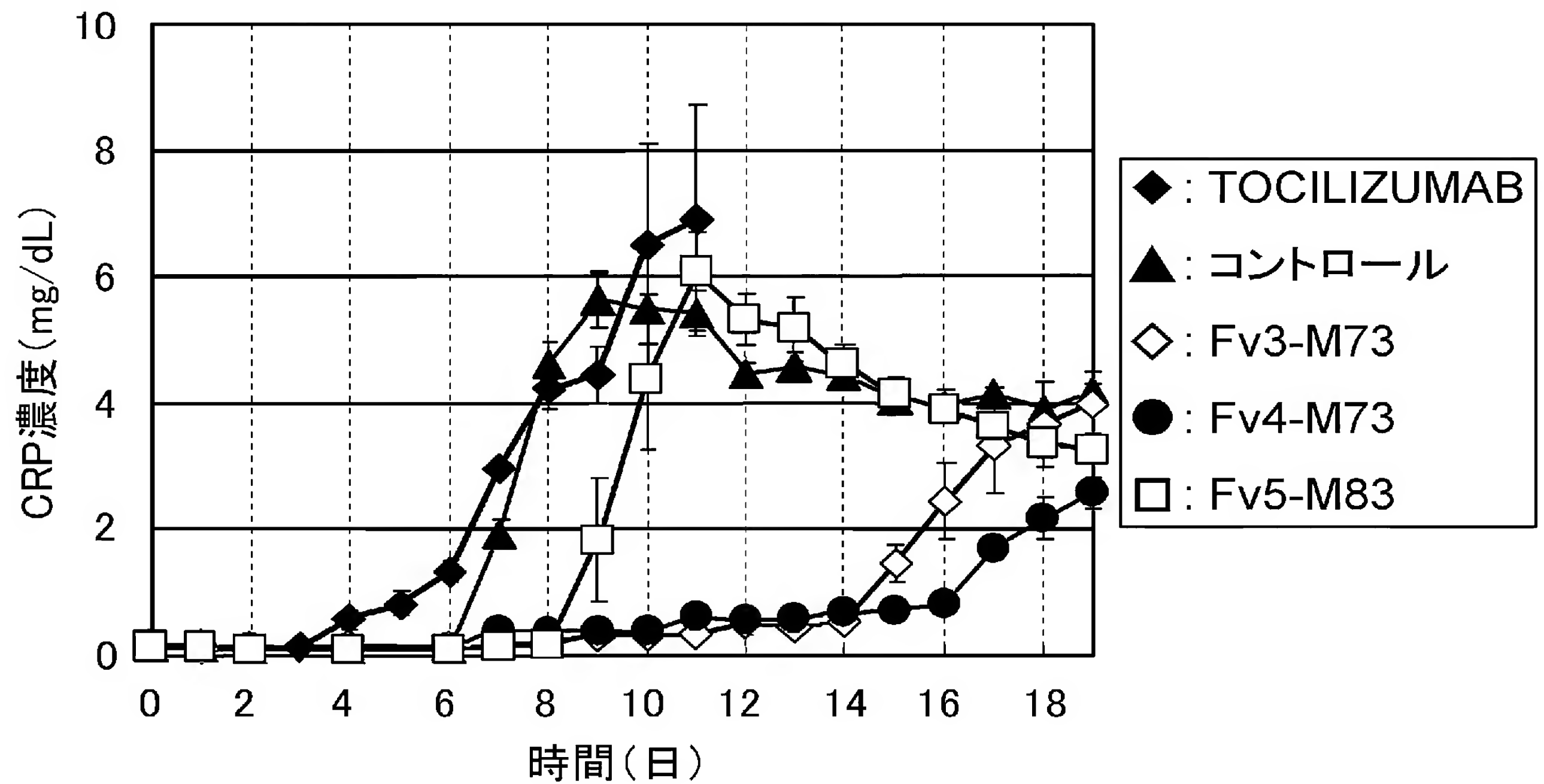




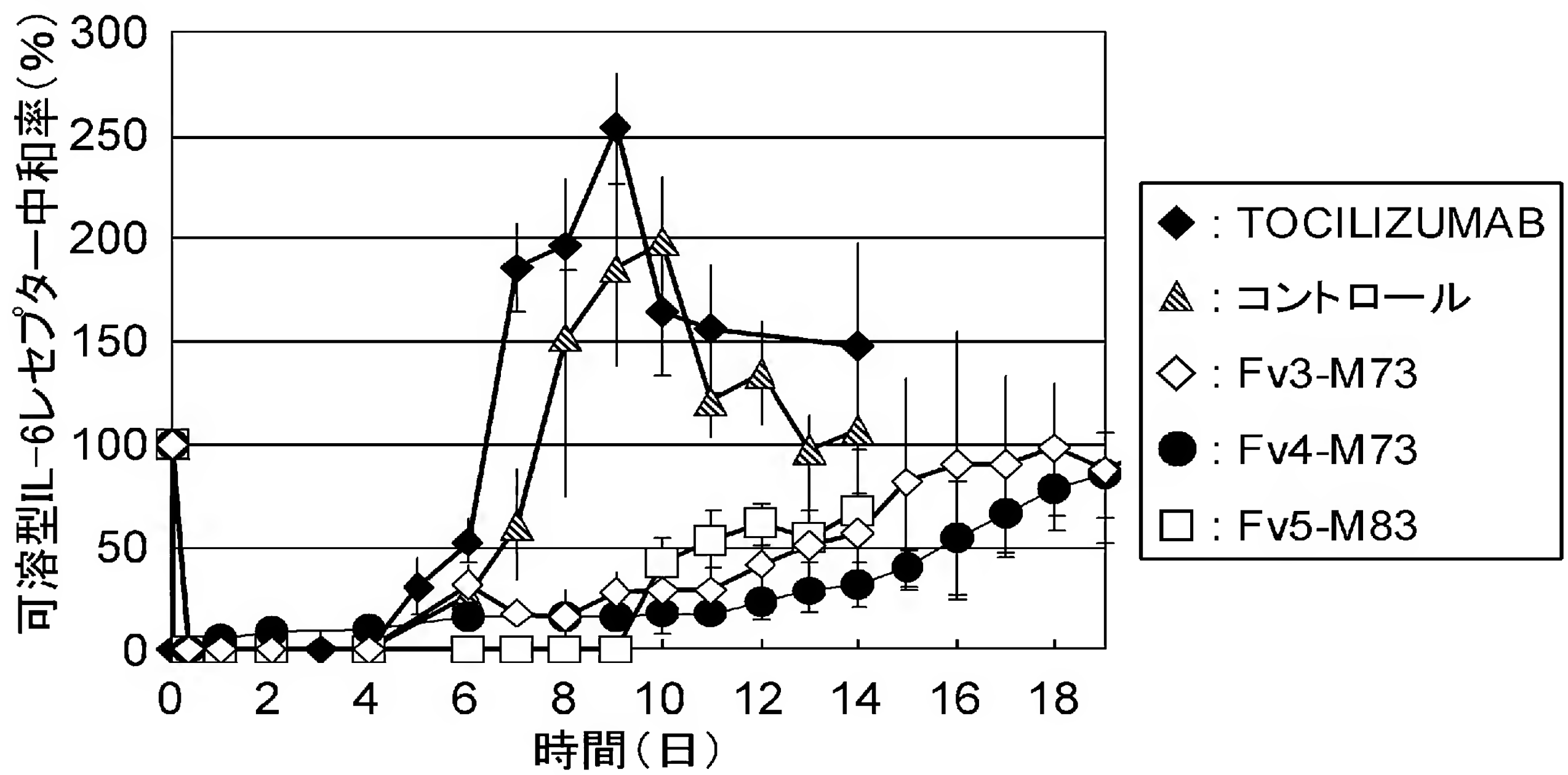
WO 2009/041621

PCT/JP2008/067499

[図47]



[図48]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2008/067499

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N15/09(2006.01) i, A61K39/395(2006.01) i, C07K16/28(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/395, C07K16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAplus (STN), JSTPlus (JDreamII),  
JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SATO K. et al., Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth, Cancer Res., 1993.02.15, Vol.53, No.4, p.851-856	1-9
Y	HANES J. et al., Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display, Nat. Biotechnol., 2000.12, Vol.18, No.12, p.1287-1292	1-9
Y	EWERT S. et al., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering, Methods, 2004.10, Vol.34, No.2, p.184-199	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 October, 2008 (10.10.08)Date of mailing of the international search report  
21 October, 2008 (21.10.08)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/067499

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/070286 A2 (INNATE PHARMA S.A., UNIVERSITA DI GENOVA), 06 July, 2006 (06.07.06), Page 63, lines 4 to 22 & EP 1831258 A & JP 2008-525520 A	1-9
Y	CHIRINO A.J. et al., Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics, Drug Discov. Today, 2004.01.15, Vol.9, No.2, p.82-90	1-9
Y	TAN P.H. et al., Engineering the isoelectric point of a renal cell carcinoma targeting antibody greatly enhances scFv solubility, Immunotechnology, 1998.10, Vol.4, No.2, p.107-114	1-9

国際調査報告		国際出願番号 P C T / J P 2 0 0 8 / 0 6 7 4 9 9	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, C07K16/28			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), C A p l u s (STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
Y	SATO K. et al., Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth, Cancer Res., 1993.02.15, Vol.53, No.4, p.851-856		1-9
Y	HANES J. et al., Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display, Nat. Biotechnol., 2000.12, Vol.18, No.12, p.1287-1292		1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 1 0 . 1 0 . 2 0 0 8		国際調査報告の発送日 2 1 . 1 0 . 2 0 0 8	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 小金井 悟 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 3 9 6 1



C（続き）． 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EWERT S. et al., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering, Methods, 2004.10, Vol.34, No.2, p.184-199	1-9
Y	WO 2006/070286 A2 (INNATE PHARMA S. A. 及び UNIVERSITA DI GENOVA) 2006.07.06, 第 63 頁第 4-22 行 & EP 1831258 A & JP 2008-525520 A	1-9
Y	CHIRINO A. J. et al., Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics, Drug Discov. Today, 2004.01.15, Vol.9, No.2, p.82-90	1-9
Y	TAN P. H. et al., Engineering the isoelectric point of a renal cell carcinoma targeting antibody greatly enhances scFv solubility, Immunotechnology, 1998.10, Vol.4, No.2, p.107-114	1-9